



Excitabilité intrinsèque, couverture synaptique et vacuolisation dendritique des motoneurones spinaux chez la souris SOD1-G93A, modèle de la Sclérose Latérale Amyotrophique

Nicolas Delestrée

► To cite this version:

Nicolas Delestrée. Excitabilité intrinsèque, couverture synaptique et vacuolisation dendritique des motoneurones spinaux chez la souris SOD1-G93A, modèle de la Sclérose Latérale Amyotrophique. Neurosciences. Université René Descartes - Paris V, 2014. Français. NNT : 2014PA05T035 . tel-01127171

HAL Id: tel-01127171

<https://theses.hal.science/tel-01127171>

Submitted on 7 Mar 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Thèse de Doctorat de l'Université Paris Descartes

Spécialité
Neurosciences



École Doctorale
Cerveau-Comportement-Cognition

Présentée par
M. Nicolas Delestrée

pour l'obtention du grade de
Docteur de l'Université Paris Descartes

**Excitabilité intrinsèque, couverture synaptique et
vacuolisation dendritique des motoneurones
spinaux chez la souris SOD1-G93A, modèle de la
Sclérose Latérale Amyotrophique**

Soutenue publiquement le 27 octobre 2014

Devant le jury composé de:

M. Pascal BRANCHEREAU	Université Bordeaux	Rapporteur
M. Frédéric BROCARD	Université Aix-Marseille	Rapporteur
Mme. Séverine BOILLEE	Université Pierre et Marie Curie	Examinatrice
M. Stéphane CHARPIER	Université Pierre et Marie Curie	Examineur
M. Daniel ZYTNIKI	Université Paris Descartes	Directeur de thèse

“Life would be tragic if it weren't funny.”

— Stephen Hawking

Remerciements

En premier lieu, je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Pascal Branchereau, Frédéric Brocard, Séverine Boillée et Stéphane Charpier pour avoir accepté de constituer mon jury de thèse.

Je remercie chaleureusement Daniel Zytnicki d'avoir supervisé mon travail pendant ces quatre années. J'ai pu profiter de ses connaissances scientifiques pour comprendre un peu mieux le fonctionnement du système moteur et je m'estime très chanceux d'avoir pu profiter d'un encadrement de cette qualité. Travailler à ses côtés m'a permis de conserver ma passion pour les sciences et de cerner les différentes facettes du difficile mais excitant métier de chercheur. Il a su créer un cadre de travail dans lequel il fût très facile de s'intégrer et où il est toujours agréable de travailler. Merci pour ta patience, ton indulgence, tes encouragements et ce petit excès de stress qui compense ma relaxation parfois excessive. Merci également de m'avoir envoyé à plusieurs reprises montrer mon travail aux quatre coins de la planète et de continuer à me rappeler les *deadlines* que j'oublie trop souvent.

Je remercie tous les membres de mon équipe : Boris Lamotte d'Incamps, expert des Renshaw, Marin Manuel pour son regard avisé, Rebecca Manuel qui veille sur nos souris, et Clémence Martinot, pour son aide et son efficacité. Je pense également aux anciens membres : Caroline Iglesias, qui nous rappelle souvent que les humains *aussi* ont des motoneurones et Felix Leroy, râleur invétéré mais surtout ami sur lequel j'ai toujours pu compter. Merci pour le dynamisme que vous avez entretenu au quotidien pendant ces quelques années.

Sans oublier tous les membres du laboratoire que j'ai pu côtoyer : Nelson, Alessandro et Mélodie avec qui j'ai partagé le bureau, Visou, irremplaçable chevalier noir, David, immunologiste incisif, Arthur, Gianluigi, Carole, Bill, Ludivine, Elisa, Alexis, Takafumi, Shrisha, Erwan, Adrien, Thomas et tous les autres qui forment ensemble un surprenant mélange biophysique. Je remercie particulièrement Maud, Carole et Hervé qui s'efforcent de faire tourner la boutique dans la bonne humeur et Claude Meunier, maintenant à la tête de tout ce petit monde.

Merci aussi à tous mes professeurs pour la formation qu'il m'ont prodigué et aux membres des laboratoires voisins dont les portes ont toujours été grandes ouvertes quand j'avais besoin de leur aide.

Merci également à tous les membres des plateformes techniques des Saints-Pères pour leur travail irréprochable et leur appui. Particulièrement à Claire Mader et son équipe qui nous permettent de conserver nos lignées de souris dans les meilleures conditions qui soient, Jean-Maurice Petit dont les talents nous ont permis de faire de magnifiques images et Patrice Jegouzo qui a maintes fois trouvé la solution à nos problèmes mécaniques.

Mes pensées vont également à tous mes amis : Merci à François, Robin, Aurélien, Karl, Catalina, Tartif, Jux et Alix pour nos excursions musicales et toutes ces bonnes soirées à « tester » de nouveaux bars. Merci à Jo et Julien pour ces bons moments passés à discuter de la vie, sur et sous terre. Merci à Olivier, Manu, Elsouille, Magic Sophie, Super Sophie, Kelly et Quan, pour tous ces moments à traîner sur les quais et à bousiller les moquettes. Merci aussi à Jean, Carole et Esther que j'ai suivi sur la voie des neurosciences depuis les bancs de la fac. Merci à Jordan, Jelena, Jerem, Pierre, Mry et tous les autres que je n'ai pas cité mais qui me sont chers. Merci à tous pour leur soutien, leur bonne humeur et pour tous ces moments, à Paris ou plus loin, qui ont parsemés ces quatre années de thèse.

Je tiens également à exprimer ma reconnaissance à tous les membres de ma famille. Ils sont bien trop nombreux pour que je les cite tous, mais c'est toujours un immense plaisir de passer du temps avec mes oncles et ma grand-mère en Bretagne ou dans le midi ainsi qu'avec mes oncles, tantes, cousins et cousines à Amiens pour notre réunion de famille annuelle. J'ai une pensée toute particulière pour mon grand-père maternel qui m'a donné le goût des livres et des sciences naturelles.

Je remercie bien sûr affectueusement mes parents pour leur soutien inconditionnel, leur gentillesse et leurs encouragements maintes fois répétés. Vous avez su m'inculquer des valeurs qui me guident quotidiennement et vous restez pour moi un modèle inébranlable. Il me reste encore beaucoup de choses à apprendre de vous pour le futur, m'inquiéter des choses importantes en temps et en heure par exemple...

Merci à mon frère, Quentin, pour tous ces excellents moments que nous avons partagé et pour la confiance mutuelle qui nous lie. Je suis extrêmement fier de ce que tu es devenu et il m'est agréable de penser que l'on pourra toujours compter l'un sur l'autre. Si tu m'as surnommé « la Science » depuis un bon moment, tu peux maintenant ajouter un « Dr. » devant.

Je tiens finalement à remercier Guadalupe qui partage ma vie depuis quelques années maintenant. Merci pour ton aide et ton soutien sans faille et d'avoir supporté ces quelques semaines de travail nocturne pendant la rédaction de cette thèse. Je te suis extrêmement reconnaissant d'avoir répondu à mes interrogations et angoisses passagères et de m'avoir supporté dans les bons comme dans le mauvais moments. J'espère profondément que notre prochaine étape outre-atlantique sera aussi heureuse que celle qui s'achève.

J'ai bien peur d'avoir oublié beaucoup trop de monde et de ne pas avoir été très avare dans l'éloge, mais c'est encore en deçà de la reconnaissance que j'éprouve envers toutes ces personnes.

Table des Matières

Introduction (p1)

- 1 / Hétérogénéité des motoneurones
- 2 / Sclérose Latérale Amyotrophique
- 3 / Contenu de la thèse

Chapitre I - Excitabilité intrinsèque des motoneurones (p11)

- A / Morphologie des motoneurones
- B / Propriétés passives
- C / Courant I_h
- D / courant d'*afterhyperpolarisation* (AHP)
- E / courants entrants persistants
- F / Variations du seuil des potentiels d'action au cours de la décharge
- G / Neuromodulation

Chapitre II – Oscillations de mode mixte dans les motoneurones de souris et leur relation à l'excitabilité (p35)

- Introduction
- Méthodes
- Résultats
- Conclusions

Article 1 – Mixed Mode Oscillations in Mouse Spinal Motoneurons Arise from a Low Excitability State (p49)

Chapitre III - Altérations des propriétés des motoneurones au cours de la SLA (p51)

- A / Modèles SOD1
- B / Progression de la maladie dans le modèle SOD1-G93A
- C / Physiopathologie
- D / Modifications de l'excitabilité intrinsèque des motoneurones dans la SLA
- E / Vulnérabilité différentielle

Chapitre IV – Excitabilité des motoneurones spinaux de souris SOD1-G93A adultes (p71)

- Introduction
- Méthodes
- Résultats
- Conclusions

Article 2 – Adult spinal motoneurons are not hyperexcitable in a mouse model of inherited amyotrophic lateral sclerosis (p83)

Chapitre V – Vacuolisation de l'arborisation dendritique et couverture synaptique dans le modèle SOD1-G93A (p85)

- Introduction
- Méthodes
- Résultats
- Conclusions

Discussion (p103)

- 1 / Rôle des MMOs dans le comportement moteur chez la souris
- 2 / Diminution de l'excitabilité membranaire dans les souris SOD1-G93A adultes
- 3 / Vacuolisation dendritique et excitotoxicité
- 4 / Perspectives

Bibliographie (p117)

Table des Illustrations

Figure 1 : Représentation schématique des différents types d'unités motrices. (p4)

Figure 2 : Morphologie de l'arborisation dendritique des motoneurones de chat. (p13)

Figure 3 : Mise en évidence du courant de fléchissement et résonance membranaire des motoneurones. (p17)

Figure 4 : Effets de l'AHP sur la fréquence de décharge. (p22)

Figure 5 : Courants entrants persistants dans les motoneurones et effets sur la décharge. (p26)

Figure 6 : Amplification de l'entrée synaptique I_a par les courants entrants persistants. (p29)

Figure 7 : Amplification différentielle dans les motoneurones résonants et non-résonants. (p30)

Figure 8 : Variation du seuil des potentiels d'action durant la décharge répétitive. (p32)

Figure 9 : Oscillations sous-seuil durant la décharge des motoneurones de souris. (p36)

Figure 10 : Dénervation des jonctions neuromusculaires dans le modèle SOD1-G93A. (p54)

Figure 11 : Hypothèses sur le gain de fonction toxique de la SOD1 mutée. (p56)

Figure 12 : Mécanismes cellulaires et moléculaires responsables de la neurodégénérescence dans la SLA. (p63)

Figure 13 : Varicosités dendritiques des motoneurones et vacuolisation. (p91)

Figure 14 : Augmentation de la taille des varicosités SOD1 avec la progression de la maladie. (p93)

Figure 15 : Répartition des varicosités sur l'arborisation dendritique des motoneurones et vacuolisation. (p95)

Figure 16 : Progression différentielle de la taille des varicosités entre motoneurones *Fast* et *Slow*. (p97)

Figure 17 : Répartition des contacts synaptiques sur l'arborisation dendritique des motoneurones. (p99)

Introduction

Le motoneurone constitue l'interface entre le système nerveux central et le système musculaire. Cette position remarquable dans l'organisation des réseaux neuronaux en fait le point de convergence ou « voie finale commune » de la totalité de l'information motrice, qu'elle soit d'origine centrale ou périphérique. Le motoneurone a donc pour fonction d'intégrer de nombreuses entrées synaptiques afin de transmettre une excitation cohérente aux muscles. Ces entrées synaptiques, directes ou indirectes, proviennent à la fois des voies motrices descendantes (cortico-spinale, vestibulo-spinale, rubro-spinale et réticulo-spinale), des circuits spinaux (Jankowska 2001) et des systèmes sensoriels tels que les mécano-récepteurs musculaires (organes tendineux de Golgi et fuseaux neuromusculaires) (Matthews 1972), les organes sensoriels cutanés (corpuscules de Pacini et Meissner, Cellules de Merkel et terminaisons libres) et articulaires (corpuscules de Ruffini). Les entrées synaptiques, en majorité sur l'arborisation dendritique, convergent vers le soma du motoneurone où elles sont sommées et déclenchent un train de potentiels d'action qui transmis aux fibres musculaires généreront leur contraction. On sait, depuis les travaux du Sir Charles Sherrington, nobélisé en 1932, que chez le mammifère adulte, un motoneurone unique innerve un nombre variable de fibres musculaires partageant des propriétés mécaniques similaires et qu'une fibre musculaire n'est innervée que par un seul motoneurone (Liddell & Sherrington 1925; Redfern 1970; Jansen & Fladby 1990; Van Essen et al. 1990). L'ensemble constitué du motoneurone et de la totalité des fibres qu'il innerve est désigné, depuis les travaux de Liddell et Sherrington, sous le terme d' « unité motrice ».

Considérant sa taille importante par rapport aux autres neurones et sa fonction précisément définie, le motoneurone fut le candidat idéal pour les premiers enregistrements intracellulaires de neurones centraux (Brock et al. 1952). C'est en utilisant cette technique que Sir John C. Eccles a pu étudier la transmission synaptique entre les neurones et l'organisation des circuits spinaux. Ces travaux lui ont valu le prix Nobel en 1963 (partagé avec Hodgkin et Huxley). Alors considérée comme purement linéaire, on sait maintenant que l'intégration de l'information synaptique est transformée par les motoneurones de façon plus complexe (Hounsgaard et al. 1984; 1988). Elle est en effet modulée par de nombreuses conductances voltage-dépendantes qui participent à définir

l'excitabilité des motoneurones. La première de ces conductances à avoir été décrite permet un courant calcique entrant persistant (Schwindt & Crill 1984; Conway et al. 1988) qui peut amplifier les entrées synaptiques (Lee & Heckman 1996; 1998a; 1998b; 2000; Bennett et al. 1998; Hultborn et al. 2003). Plus récemment, un autre type de courant persistant, sodique cette fois-ci, a été mis en évidence (Li & Bennett 2003) et semble jouer un rôle important dans le maintien de la décharge (Lee & Heckman 2001; Harvey et al. 2006a). Finalement, certaines conductances membranaires actives sous le seuil de décharge, comme le courant cationique mixte I_h , permettent de filtrer les entrées synaptiques selon leurs fréquences (Manuel et al. 2007). D'autres courants non voltage-dépendants tel que le courant d' « afterhyperpolarisation » (Coombs et al. 1957), modulent également la décharge des motoneurones (Daniel Kernell 1965). La variété de ces courants permet aux motoneurones de répondre efficacement aux informations synaptiques qu'ils reçoivent et de provoquer une contraction adéquate des fibres musculaires innervées.

1 / Hétérogénéité des motoneurones

Les motoneurones constituent une population de neurones très hétérogène. On peut identifier plusieurs catégories de motoneurones en se basant sur le type de fibres musculaires qu'ils innervent, leurs propriétés électriques intrinsèques, leur taille, leurs propriétés moléculaires ou encore leur place dans les circuits spinaux. En premier lieu, les motoneurones *gamma* innervent les fuseaux neuromusculaires (Langley 1922; Kuffler et al. 1951; Matthews 2011) alors que les motoneurones *alpha* innervent exclusivement les fibres musculaires extrafusales. Les motoneurones *bêta* innervent à la fois les deux types de fibres (Bessou et al. 1965). Parmi les motoneurones *bêta* et *gamma*, on distingue encore deux classes différentes sur la base de leur action sur les fuseaux neuromusculaires. Les motoneurones *bêta* et *gamma* « dynamiques » innervent les fibres intrafusales à sacs de type 1 (bag 1) et augmentent la sensibilité du fuseau à coder les variations de la longueur du muscle. Les motoneurones *bêta* et *gamma* « statiques » innervent quant à eux les fibres à sacs de types 2 (bag 2) ainsi que les fibres à chaînes et augmentent le gain du codage de la longueur musculaire (Bessou et al. 1965; Emonet-Denand et al. 1977) (Figure 1). Les motoneurones *alpha*, bien que partageant globalement les mêmes entrées synaptiques (Mendell & Henneman 1968; Henneman 1985), peuvent

innervent des fibres musculaires aux propriétés contractiles distinctes. On peut définir trois catégories d'unités motrices *alpha* sur les critères de la vitesse de contraction de leurs fibres musculaires et de leur capacité à soutenir une contraction prolongée (Burke et al. 1971; 1973). Les unités motrices de type S (*Slow*) ont une contraction lente et leur matériel contractile est résistant à la fatigue, les unités motrices FR (*Fast-Resistant*) ont une contraction rapide et sont également résistantes à la fatigue et enfin les unités motrices FF (*Fast-Fatiguable*) ont les temps de contraction les plus rapides mais sont incapables de maintenir une contraction prolongée (Figure 1). Chez le mammifère, chaque muscle possède ces trois types d'unités motrices en proportions très variables. Chez le chat et le rat, le muscle gastrocnémien médial est par exemple constitué des trois types d'unités motrices en proportions similaires (Stein and Padykula 1962; Mcphedran et al. 1965a; Burke et al. 1973) alors que le muscle soléaire est presque exclusivement constitué d'unités motrices de type S (Mcphedran et al. 1965b).

On observe une remarquable correspondance entre les propriétés contractiles des différents types d'unités motrices et les profils moléculaires des fibres musculaires qu'elles contiennent. Les travaux de Brooke et Kaiser ont tout d'abord permis de distinguer trois catégories de fibres musculaires (I, IIA et IIB) sur la base de la réactivité de leur ATPase (Brooke & Kaiser 1970). Grâce à la technique de déplétion glycogénique (épuisement des réserves de glycogène des fibres musculaires d'une unité motrice unique suite à sa stimulation répétée), Burke a mis en évidence l'homogénéité des fibres musculaires au sein d'une même unité motrice et a pu associer les différents profils histochimiques de fibres musculaires avec les différents types d'unités motrices : I, IIA et IIB pour les unités motrices S, FR et FF respectivement (Burke et al. 1971). Les différences de propriétés contractiles de ces fibres musculaires correspondent à une expression différentielle des isoformes de chaînes lourdes de myosine (Schiaffino et al. 1988).

La technique de déplétion glycogénique a également permis un comptage du nombre de fibres musculaires contenues dans chaque unité motrice. Il a ainsi été montré que les unités motrices FF contenaient un grand nombre de fibres à l'inverse des unités motrices de type S qui n'en contenaient que très peu ; les unités motrices FR en contenant un nombre intermédiaire (Burke & Tsairis 1973 ; Figure 1). De façon intéressante, la taille du soma de leurs motoneurones ainsi que le diamètre de leurs axones sont proportionnels au nombre de fibres musculaires qui composent les unités motrices (Burke et al. 1982).

Les motoneurones S, n'innervant que les fibres à contraction lente, forment les plus petites des unités motrices et ont ainsi les corps cellulaires les plus compacts. A l'opposé de ceux-ci, les motoneurones des unités motrices FF ont les somas et les axones les plus gros (Figure 1). Ces différences corroborent le fait que les unités motrices FF ont une vitesse de conduction rapide et développent des forces importantes à l'inverse des unités motrices S qui ont une faible vitesse de conduction et développent peu de force (Burke 1981).

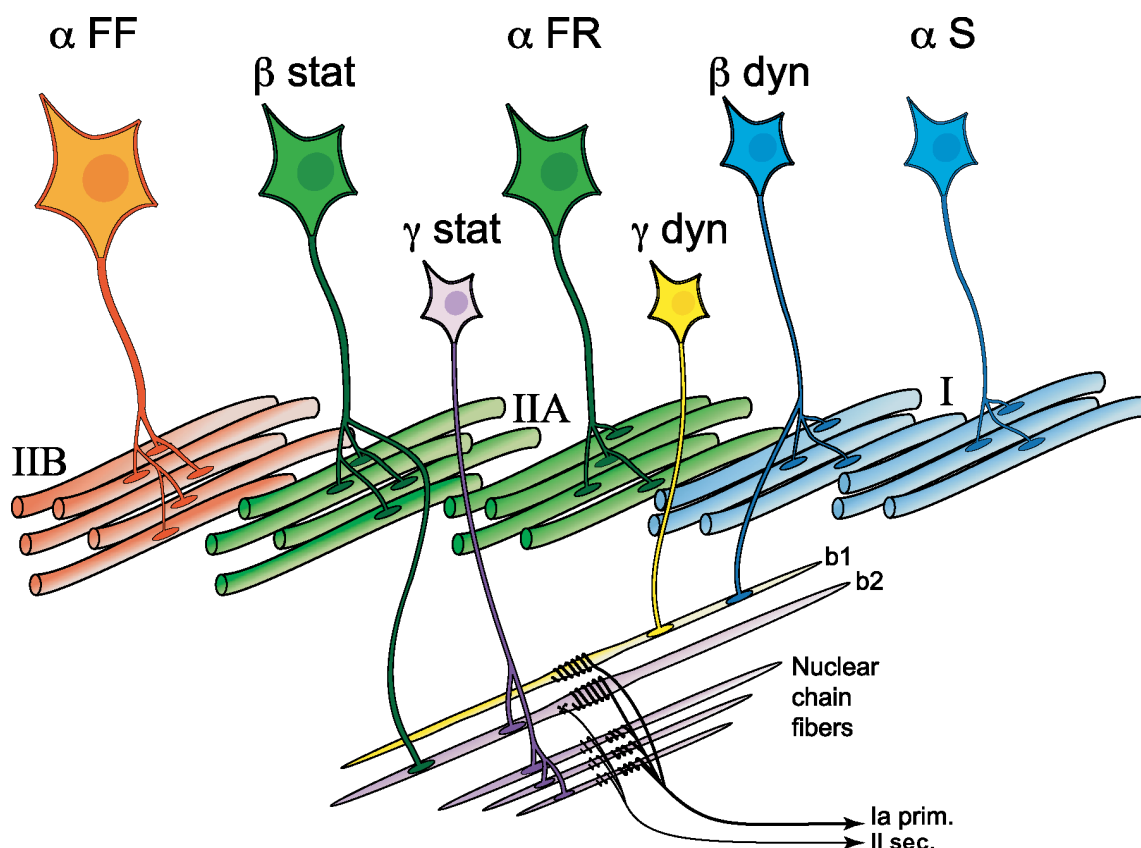


Figure1. Représentation schématique des différents types d'unités motrices. Les motoneurones α innervent exclusivement les fibres musculaires extrafusales. Parmi eux, les motoneurones FF ont les plus gros corps cellulaires et les plus larges diamètres axonaux, ils innervent un grand nombre de fibres musculaires extrafusales de type IIB. Les motoneurones FR ont des corps cellulaires et axones légèrement plus petits et innervent un nombre intermédiaire de fibres musculaires de type IIA. Les motoneurones S sont les plus petits des motoneurones α (corps cellulaires et axones) et innervent un petit nombre de fibres musculaires de type I. Les motoneurones β sont des motoneurones squelette-fusimoteurs : ils innervent à la fois des fibres musculaires extra- et intrafusales. Les motoneurones β statiques innervent des fibres extrafusales IIA et des fibres intrafusales à sac de type 2. Les motoneurones β dynamiques innervent des fibres extrafusales de type I et des fibres intrafusales à sac de type 1. Les motoneurones γ innervent exclusivement les fibres intrafusales. Les motoneurones γ statiques innervent les fibres à sacs de type 2 et les fibres à chaîne nucléaire. Les motoneurones γ dynamiques innervent les fibres à sacs de type 1 uniquement. Dans les muscles, les fibres musculaires extrafusales des différents types sont organisées en mosaïque alors que les fibres intrafusales, plus petites sont encapsulées dans les fuseaux neuromusculaires. Ces fuseaux sont également innervées par des afférences sensorielles. Les fibres sensorielles Ia innervent à la fois les fibres à sacs et à chaînes en leur partie équatoriale alors que les fibres sensorielles du type II n'innervent que les fibres à chaînes dans leur partie juxta-équatoriale. Adaptée de Manuel & Zytnicki 2011.

De par la variété des propriétés contractiles des fibres musculaires, l'ordre dans lequel les unités motrices sont recrutées est important pour la gradation de la force développée par le muscle. L'excitabilité d'un motoneurone est généralement quantifiée par la quantité de courant nécessaire pour le recruter (pour émettre un potentiel d'action), ainsi que par le gain de sa relation entrée-sortie. Or l'excitabilité des différents types de motoneurones est étonnamment bien adaptée à la fonction supposée de leur unité motrice (Daniel Kernell 2006). Les unités motrices S et FR sont principalement impliquées dans l'activité posturale qui nécessite une tension musculaire constante sur de longues durées. Or ces unités motrices sont les plus excitables, c'est à dire que leurs motoneurones sont capables d'émettre des potentiels d'actions en réponse à des courants synaptiques modérés. Durant le comportement postural, une faible activité des réseaux spinaux est donc suffisante pour les recruter afin de produire une contraction musculaire faible mais tonique. Les unités motrices FF sont quant à elles impliquées dans des mouvements puissants mais sont très susceptibles à la fatigue, or elles sont également les moins excitables. Elles nécessitent des entrées synaptiques plus importantes pour décharger et ne seront recrutées que pour des mouvements temporaires. Puisque les motoneurones S sont les plus petits et les FF les plus gros, leur ordre de recrutement suit le « principe de taille » énoncé par Henneman : plus un motoneurone est petit plus il sera susceptible de décharger en réponse à un courant synaptique faible (Henneman 1957). Cette relation s'explique par le lien entre la taille des motoneurones et leur résistance d'entrée, qui est un facteur important de leur excitabilité. Un petit motoneurone sera électriquement plus résistant et son voltage sera donc plus sensible aux courants synaptiques perçus. Il sera donc plus facilement dépolarisé vers son seuil de décharge. Une fois les motoneurones recrutés, la façon dont ils modulent l'amplitude des contractions musculaires est codée par leur fréquence de décharge. Un potentiel d'action isolé déclenchera une contraction unitaire des fibres musculaires et une force relativement faible. Mais lorsque ces fibres reçoivent un train de potentiels d'action, leurs contractions vont se sommer d'autant plus que la fréquence du train sera grande. Une fois recrutés, les motoneurones doivent décharger à une fréquence adaptée pour produire la force musculaire souhaitée pour un mouvement donné.

Les propriétés d'excitabilité des motoneurones diffèrent entre les espèces selon les besoins de leurs comportements respectifs (la fréquence de la locomotion est par exemple beaucoup plus rapide chez la souris que chez le chat). Largement étudiées chez le chat et

le rat, ces propriétés n'avaient pas été décrites chez la souris jusqu'à récemment. Or la souris devient un modèle de référence pour l'étude de la physiologie des motoneurones depuis la démocratisation des modèles transgéniques. C'est la raison pour laquelle mon équipe a investi beaucoup d'efforts pour mettre au point une préparation permettant des enregistrements intracellulaires stables de motoneurones spinaux de souris *in vivo*. Mon équipe a ainsi été la première à caractériser les propriétés passives et les propriétés de décharge des motoneurones spinaux de souris adultes (Manuel et al. 2009; Meehan et al. 2010). Ce travail a mis en évidence un phénomène d'oscillation du potentiel membranaire à haute fréquence (100-150Hz) qui n'avait pas été décrit dans les motoneurones de chats. Ces oscillations sous-seuil jouent un rôle dans le recrutement des motoneurones et dans leur décharge. Elles prennent place entre les potentiels d'action et définissent un régime d'oscillations de mode mixte (MMOs pour Mixed Mode Oscillations), caractérisé par l'alternance d'événements de faible amplitude à haute fréquence (les oscillations) avec des événements plus amples à basse fréquence (les potentiels d'action). Le mécanisme responsable de l'émergence de ces MMOs n'était alors pas connu.

La première partie de mon travail de thèse a donc été consacrée à l'étude du mécanisme responsable du régime d'oscillations de mode mixte.

2 / Sclérose Latérale Amyotrophique

La Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA), encore appelée « maladie de Charcot », est une pathologie neurodégénérative caractérisée par une atteinte spécifique des motoneurones spinaux, bulbaires et corticaux. Son incidence, comprise entre 1,5 et 2,5/100000 (McGuire et al. 1996; Logroscino et al. 2010), fait de la SLA la maladie neurodégénérative des motoneurones la plus répandue. Les individus des deux sexes sont concernés par cette pathologie avec une légère prédominance masculine (1.5/1) (Logroscino et al. 2010). La pathologie se manifeste autour de 60 ans en moyenne et peut se présenter sous deux formes principales : la forme « spinale », qui débute par l'atteinte des membres, et la forme « bulbaire », qui débute par l'atteinte des muscles faciaux et gutturaux. La forme spinale représente les deux tiers des cas. Les premiers symptômes comportent un affaiblissement musculaire, des pertes d'équilibre, une maladresse dans les mouvements de la main et une raideur musculaire (spasticité). Elle est due à la

dégénérescence des motoneurones situés dans la moelle épinière. Dans la forme bulbaire de la maladie, les patients commencent par rencontrer des difficultés d'élocution et une gêne lors de la déglutition. Elle correspond à la dégénérescence des motoneurones situés dans la région du cerveau qui commande, entre autres, les mouvements de la langue et du palais : le bulbe rachidien. Ces deux formes peuvent se succéder ou se développer simultanément mais la maladie progresse dans la grande majorité des cas vers une forme complète (spinale et bulbaire). Lors de son développement, la maladie entraîne une atrophie et une paralysie progressive des muscles squelettiques, sous contrôle volontaire, qui se propage depuis les membres (forme spinale) ou le visage (forme bulbaire) vers le tronc. Le décès des patients, par insuffisance respiratoire, survient lorsque les muscles du diaphragme et de la paroi thoracique perdent leur motricité. Le diagnostic clinique n'est réalisé que très tardivement dans la progression de la maladie. Il est basé sur la mise en évidence de signes de l'atteinte des motoneurones bulbaires ou spinaux par des enregistrements électroneuromyographiques. Chez les patients, ces enregistrements révèlent une diminution de l'amplitude des potentiels d'action musculaires, une diminution de la vitesse de conduction motrice ainsi qu'une augmentation de la latence distale à la jonction neuromusculaire (Couratier et al. 2014). Une grande proportion des motoneurones a alors déjà dégénéré et le décès du patient survient en moyenne entre un et cinq ans après le diagnostic. Bien que décrite avec précision depuis 1869 par le neurologue Jean-Martin Charcot (Charcot & Joffroy 1869), la maladie reste aujourd'hui sans traitement efficace.

Des mutations sur plus d'une trentaine de gènes ont été identifiées chez les patients SLA (Leblond et al. 2014). Parmi ces gènes, celui codant pour la superoxyde dismutase 1 (SOD1) semble être le plus fréquemment muté. Des modèles transgéniques de la maladie ont été créés à partir de ces mutations afin de pouvoir étudier les mécanismes conduisant les motoneurones à leur dégénérescence (M. R. Turner et al. 2013). Les souris SOD1-G93A, qui expriment la SOD1 humaine mutée, développent une pathologie dont les caractéristiques sont comparables à celles de la SLA humaine (Gurney et al. 1994). Elles montrent une dégénérescence spécifique de leurs motoneurones à l'âge adulte qui commence à la périphérie par la dénervation des jonctions neuromusculaires pour se propager ensuite au corps cellulaires (Fischer & Glass 2007).

De nombreuses hypothèses pour expliquer la dégénérescence des motoneurones ont émergé des études effectuées sur les modèles transgéniques. En tête, une excitotoxicité liée au glutamate pourrait être en cause (Cleveland & Rothstein 2001). Le glutamate, en concentration excessive, est connu pour sa toxicité à la fois par l'induction d'une entrée massive et délétère de calcium dans la cellule (Roy et al. 1998) et par l'activation des voies apoptotiques via les récepteurs NMDA extra-synaptiques (Hardingham et al. 2002). Par extension, tous les mécanismes (intrinsèques et extrinsèques) augmentant l'excitabilité des motoneurones sont susceptibles d'avoir un impact négatif sur leur survie via une surcharge calcique lors de leur décharge. Plusieurs études font justement état de modifications des propriétés électriques des motoneurones très précocement dans la maladie (stades embryonnaires et néo-nataux). Leurs résultats sont toutefois contradictoires. Certains auteurs rapportent une augmentation de l'excitabilité membranaire des motoneurones dans les modèles SOD1 (Pieri et al. 2003; Kuo et al. 2005; Pambo-Pambo et al. 2009; Martin et al. 2013). D'autres, au contraire, ont montré une baisse d'excitabilité de ces motoneurones (Bories et al. 2007; Amendola & Durand 2008). D'autres enfin montrent que l'excitabilité est maintenue de façon homéostatique (Quinlan et al. 2011). Cependant, pour que des modifications de l'excitabilité des motoneurones soient responsables de leur dégénérescence, il conviendrait qu'elles persistent jusqu'au moment de la dénervation.

La seconde partie de mon travail de thèse a donc été consacrée à la caractérisation de l'excitabilité des motoneurones dans la souris SOD1-G93A adulte, dans les jours qui précèdent leur dénervation.

La cause d'une potentielle hyperexcitabilité peut également être d'origine extrinsèque. Une augmentation de la couverture synaptique ou un déséquilibre dans la balance excitation/inhibition sur les motoneurones peut faciliter leur décharge et favoriser les entrées calciques. En ce sens, Sunico et collaborateurs (2011) ont rapporté une diminution des contacts synaptiques inhibiteurs couplée à une augmentation des contacts excitateurs sur les motoneurones hypoglossaux de souris SOD1-G93A.

J'ai consacré la dernière partie de mon travail à l'étude de la couverture synaptique des motoneurones SOD1-G93A spinaux et à sa relation avec les vacuolisations dendritiques exprimées par les motoneurones au cours de la pathologie.

3 / Contenu de la thèse

Le premier chapitre de ma thèse sera consacré à une revue des différents mécanismes qui définissent l'excitabilité intrinsèque des motoneurones. Dans le second chapitre, j'exposerai mes résultats concernant les oscillations de mode mixte observées dans les motoneurones de souris et leur rapport à l'excitabilité membranaire. Le troisième chapitre concernera la Sclérose Latérale Amyotrophique. Les hypothèses concernant ses mécanismes physiopathologiques ainsi que les connaissances que nous ont apporté les modèles murins seront passées en revue et l'accent sera mis sur les modifications des propriétés électriques des motoneurones observées dans la maladie. Le chapitre suivant sera consacré à mes travaux sur l'excitabilité intrinsèque des motoneurones de souris SOD1-G93A adultes. J'exposerai enfin, dans le chapitre V, mes résultats concernant la couverture synaptique et la vacuolisation de l'arborisation dendritique dans ce même modèle. Ce manuscrit sera conclu par une discussion de l'ensemble de mes résultats et de leur apport à la compréhension de la maladie.

Chapitre I - Excitabilité intrinsèque des motoneurones

Bien que partageant des entrées synaptiques communes, les motoneurones d'un même noyau moteur possèdent des propriétés et des fonctions différentes. Les unités motrices S, fortement impliquées dans la posture, contiennent des fibres musculaires à contraction lente. Ces fibres ne nécessitent pas d'excitation à haute fréquence pour se contracter totalement, mais l'activité posturale requiert que leur excitation soit soutenue dans le temps. Leurs motoneurones doivent donc produire des trains de potentiels d'action à fréquence modérée mais de manière prolongée, de façon à produire un tonus musculaire constant. Les unités motrices F, au contraire, sont impliquées dans des mouvements puissants de plus grande amplitude. Leurs fibres musculaires, à contraction rapide, sont aussi très fatigables. Elles nécessitent donc des excitations à plus haute fréquence mais précises dans le temps. Ainsi, les motoneurones F doivent produire des bouffées de potentiels d'action brèves mais à haute fréquence pour atteindre la fréquence de fusion tétanique musculaire et ainsi pouvoir produire la force musculaire maximale. Chaque type de motoneurones doit donc moduler et intégrer les entrées synaptiques reçues de manière différente pour transmettre aux fibres musculaires qu'ils innervent une excitation qui correspond à leurs propriétés contractiles et à leur fonction. Pour ce faire, les différents types de motoneurones disposent de propriétés d'excitabilité spécifiques. Leur excitabilité définit de quelle façon et avec quelle facilité il seront en mesure de transformer les entrées synaptiques qu'ils reçoivent des autres neurones en un train de potentiels d'action. Cette excitabilité, intrinsèque à chaque motoneurone dépend d'un grand nombre de paramètres dont les principaux sont leur morphologie, les populations de canaux ioniques passifs ou voltage-dépendants qu'ils expriment à leur membrane, leur localisation et leur densité.

A / Morphologie des motoneurones

Le motoneurone est la cellule la plus étendue du système nerveux des mammifères. Les axones des motoneurones innervant les muscles plantaires peuvent aisément dépasser la longueur d'un mètre chez l'humain, mais la taille de leur corps cellulaire et celle de leur arborisation dendritique, dans la moelle épinière, sont également très importantes. Le diamètre de leur arbre dendritique peut dépasser celui de la corne ventrale elle-même chez le chat (Rotterman et al. 2014) ou chez la souris (Filipchuk & Durand 2012). La forme de l'arborisation dendritique n'est pas complètement sphérique, elle est physiquement limitée par la forme de la moelle épinière (ce qui est d'autant plus vrai pour les motoneurones les plus latéraux) et souvent plus étendue dans l'axe rostro-caudal (Brown & Fyffe 1981; Cameron et al. 1985; Rose et al. 1985; Cullheim et al. 1987a).

De nombreuses descriptions de la morphologie des motoneurones ont pu être réalisées par injection de marqueurs intracellulaires (glycine tritiée, peroxydase du raifort, etc.) dans leurs somas via les micro-pipettes de verre utilisés pour l'enregistrement de leurs propriétés électriques (Lux et al. 1970; Barrett & Crill 1971; Zwaagstra & Kernell 1980; Brown & Fyffe 1981; Ulfhake & Kellerth 1981; Rose et al. 1985; Cullheim et al. 1987a; Clements & Redman 1989; Kernell & Zwaagstra 1989). Ces données ont permis de mesurer précisément l'étendue de l'arborisation dendritique des motoneurones ainsi que leurs propriétés morphologiques. Le motoneurone de chat par exemple, possède en plus de son axone, de 6 à 19 arbres dendritiques pouvant s'étendre jusqu'à plus d'1,5mm (Figure 2A) et la surface totale de sa membrane est de l'ordre de 500 000µm² (Cullheim et al. 1987b). Bien que la taille et la complexité d'un arbre dendritique dépendent de son orientation dans la moelle épinière (Cameron et al. 1983; Cullheim et al. 1987a; Egger et al. 1980; Rose 1981), d'une manière générale la surface membranaire des segments dendritiques (entre deux ramifications) augmente puis diminue en fonction de leur distance radiale au corps cellulaire (Figure 2D ; Bras et al. 1987; Cullheim et al. 1987b; Kernell & Zwaagstra 1989; Rose et al. 1985). Cette surface membranaire est définie par la longueur et le diamètre des segments dendritiques. Lorsque l'on suit la trajectoire des dendrites, le diamètre des segments diminue en s'éloignant du corps cellulaire alors que le nombre de bifurcations, de terminaisons dendritiques ainsi que la longueur des segments augmente dans un premier temps pour diminuer ensuite (Figure 2A, B et C). La taille et la complexité

des arbres dendritiques sont également corrélés de façon positive au diamètre de leur dendrite primaire (Cullheim & Kellerth 1978; Ulfhake & Kellerth 1981; 1983; 1984; Cameron et al. 1985; Rose et al. 1985; Clements & Redman 1989; Kernell & Zwaagstra 1989b). De la même façon il existe aussi des différences de complexité de l'arborisation suivant le type physiologique du motoneurone, les S ayant une morphologie moins étendue et moins complexe que les F (Figure 2, Cullheim et al. 1987b).

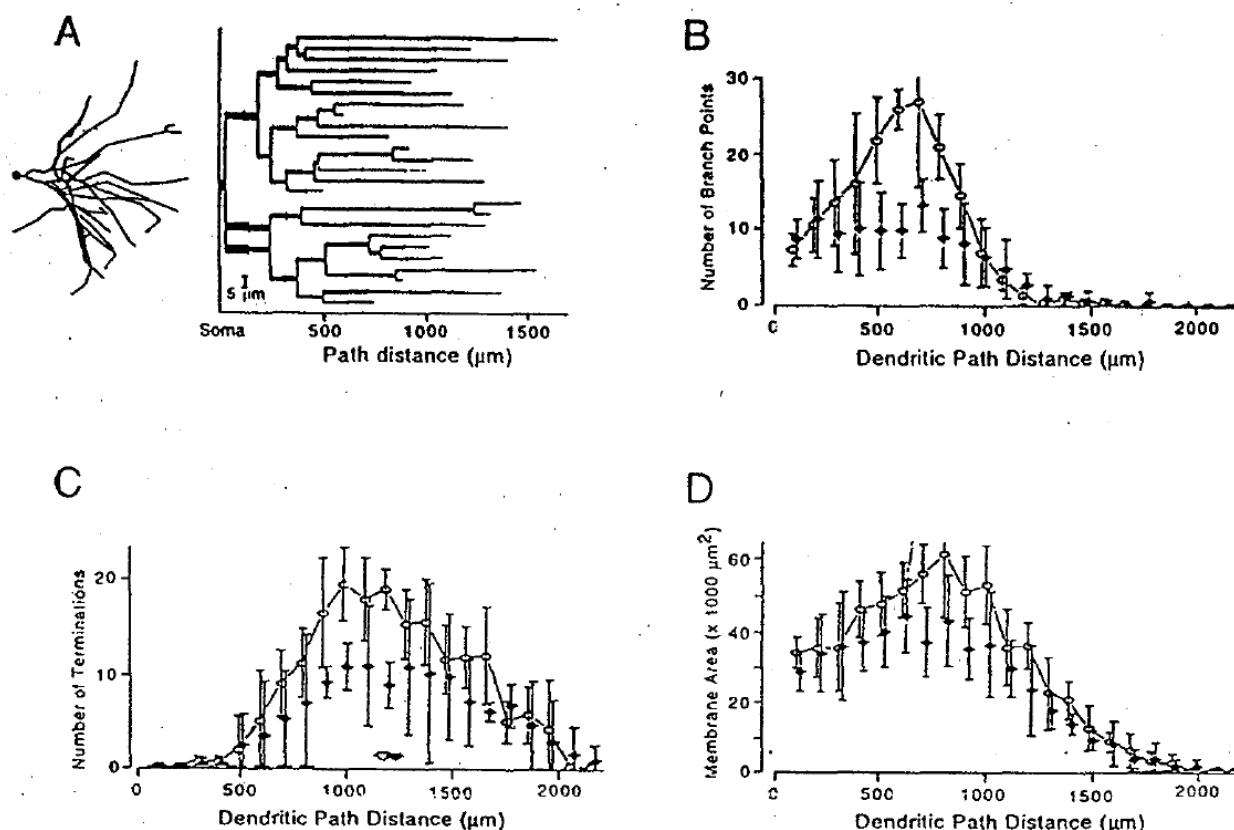


Figure 2 : Morphologie de l'arborisation dendritique des motoneurones de chat. A. Deux représentations différentes d'un arbre dendritique marqué intracellulairement à la peroxydase du raifort. Sur la gauche, projection en deux dimensions dessinée d'après observation au microscope. Sur la droite, « dendrogramme » de cet arbre dendritique. B-D. Comparaison entre un motoneurone F (symboles pleins) et un motoneurone S (symboles vides) du nombre de branchements (B), de terminaisons dendritiques (C) et d'aires membranaires des segments dendritiques (D) en fonction de leur distance au soma. Adaptée de Cullheim et al. 1987b.

Cette morphologie très étendue a des implications importantes pour l'intégration des entrées synaptiques. Les synapses sur les dendrites les plus distales n'auront pas le même poids que celles contactant directement le soma du motoneurone. Rall a proposé, en 1959, que la propagation des courants électriques dans cette arborisation pouvait être modélisée en l'assimilant à un câble équivalent au diamètre et aux propriétés électriques

uniformes. Dans ce modèle, l'arborisation dendritique est transformée en un cylindre de longueur finie où les longueurs réelles sont remplacées par des longueurs électrotoniques (mesures de la compaction électrique du neurone). Ce modèle n'est valable que si les ramifications des dendrites suivent la « règle des 3/2 » (la somme des diamètres des dendrites filles à la puissance 3/2 doit être égale au diamètre de la dendrite mère à la puissance 3/2 également). Les marquages intracellulaires de cette époque (ions métalliques, Bleu de méthylène, Fast Green, etc.) ne s'étendaient toutefois pas au-delà des dendrites proximales (Kater & Nicholson 1973) et ne permettaient pas une mesure précise de la surface du neurone, ce modèle est donc basé sur une estimation globale de la résistivité membranaire. Rall a démontré dans ce modèle que la diffusion d'un courant électrique dans l'arborisation dendritique du motoneurone dépend de sa résistance d'entrée et de sa capacité membranaire. Il a également montré que le diamètre des dendrites jouait un rôle fondamental dans la propagation des courants (Rall 1969). Il existe une grande variabilité dans le diamètre des dendrites primaires (Bras et al. 1987; 1993; Kernell & Zwaagstra 1989b; Moore & Appenteng 1991) et dans le ratio de diamètre entre dendrites mères et filles aux bifurcations (Cameron et al. 1985; Rose et al. 1985; Bras et al. 1987; Kernell & Zwaagstra 1989a; Clements & Redman 1989). Cette variabilité est responsable de grandes différences dans les propriétés électrotoniques des différents arbres dendritiques et induit un biais dans l'estimation de la longueur électrotonique des motoneurones (Glenn et al. 1987). L'arborisation des motoneurones s'écarte ainsi légèrement de la règle des 3/2 requise dans le modèle de Rall, bien que ses résultats restent dans une très large mesure toujours valables. Le modèle a toutefois été amélioré par l'attribution au cylindre d'un diamètre qui augmente puis diminue en s'éloignant du soma (Clements & Redman 1989; Fleshman et al. 1988; Holmes & Rall 1992).

B / Propriétés passives

La membrane des motoneurones, comme celle de toute cellule nerveuse, se comporte comme un circuit électrique « RC » incluant une résistance d'entrée et une capacitance d'entrée en parallèle. La résistance d'entrée est déterminée à la fois par la géométrie du neurone et par sa résistivité membranaire spécifique. Cette dernière correspond à sa résistance membranaire par unité de surface, elle-même déterminée par

la quantité de canaux ouverts de façon passive insérés à la membrane (Coombs et al. 1955). Ces canaux, ouverts de manière constitutive, sont appelés canaux de fuite et sont perméables principalement aux ions potassium. Peu sensible aux variations de voltage, les courants de fuite transitant par ces canaux sont en grande partie responsables du « potentiel de repos » des neurones (aux alentours de -70mV chez le chat; Powers & Binder 2001). Il a été démontré, dans les motoneurones de chat, une importante variabilité dans les résistivités membranaires spécifiques selon leurs trois types physiologiques. Les motoneurones S ayant une plus grande résistivité membranaire par unité de surface que celle des motoneurones FR, elle même plus grande que celle des motoneurones FF (Barrett & Crill 1971; Burke et al. 1982; Gustafsson & Pinter 1984a; 1984b; Powers & Binder 2001). Ces différences de conductivité, conjointement avec les différences de taille observées entre les motoneurones des trois types physiologiques (Les somas étant plus grands pour les motoneurones FF [50-80 μ m] que pour les FR [50-70 μ m], eux mêmes plus grands que les S [45-70 μ m] chez le chat; Burke 1981), définissent une large gamme de valeurs de résistances d'entrées pour les motoneurones [0.5-2.6M Ω chez le chat (Manuel et al. 2007), 1.3-7.2M Ω chez la souris (Manuel et al. 2009)]. Les motoneurones FF possèdent les plus petites résistances d'entrée, les FR des valeurs de résistance intermédiaires et les motoneurones S les plus grandes. Il en est de même pour les constantes de temps membranaires, qui sont dépendantes de la résistivité membranaire et de la morphologie des motoneurones. Elles s'étendent également sur une large gamme [3.9-14.3ms chez le chat (Zengel et al. 1985), 0.5-4.0ms chez la souris (Manuel et al. 2009)].

Cette gradation de la résistance d'entrée des motoneurones selon leur type physiologique est en adéquation avec le principe de taille, énoncé par Henneman (1965), selon lequel les plus petites unités motrices sont recrutées avant les plus grosses. En supposant un même courant synaptique reçu par tous les motoneurones, ceux de type S, qui sont les plus petits et qui possèdent les plus grandes résistances d'entrée, verront leur potentiel membranaire se dépolariser plus rapidement que celui des motoneurones FR ou FF, plus gros et moins résistants. Ils seront de cette façon les premiers à décharger via un train de potentiels d'action. La rhéobase des motoneurones (courant injecté nécessaire pour faire décharger le motoneurone) est en effet grandement dépendante de leur résistance membranaire. Plus un motoneurone aura une résistance élevée, plus son potentiel sera sensible au courant synaptique. De plus, les plus petits motoneurones,

possédant une constante de temps membranaire plus élevée, verront la sommation temporelle de leurs événements synaptiques plus importante que celle des gros motoneurones et déchargeront donc plus tôt. De cette façon, la force musculaire développée peut augmenter graduellement avec le recrutement progressif des unités motrices. De nombreuses études chez l'homme ont montré que le principe de la taille s'appliquait parfaitement dans de nombreuses tâches motrice (Jones et al. 1994; Feiereisen et al. 1997; Scutter & Türker 1998), le validant comme un principe physiologique robuste.

C / Courant I_h

Le principe de taille a été formulé alors que les motoneurones étaient encore perçus comme des intégrateurs passifs. Or on sait maintenant que la membrane des motoneurones est riche de canaux voltage-dépendants qui vont jouer un rôle majeur dans leur recrutement et dans l'intégration de leurs activités synaptiques. Les courants voltage-dépendants des motoneurones modulent l'émission de leurs potentiels d'action mais aussi leur comportement sous-seuil. C'est le cas du courant I_h , courant cationique mixte qui a la particularité de s'activer lorsque la membrane du motoneurone est hyperpolarisée. Il est médié par les canaux de la famille HCN (*Hyperpolarized Cyclic Nucleotide activated*) dont une fraction est à l'état ouvert au potentiel de repos du motoneurone et participe ainsi à la valeur de sa résistance d'entrée. Lorsqu'on applique à un motoneurone un créneau de courant, la réponse de son potentiel atteint un pic au bout de 15-20ms puis décroît progressivement vers un plateau qu'elle atteint au bout de 100 ms (Figure 3A; Ito & Oshima 1965). Le courant I_h est responsable de ce phénomène de fléchissement ou « sag » du potentiel membranaire (McLarnon 1995). Dans le cas d'un courant hyperpolarisant appliqué au motoneurone, le courant I_h met un certain temps à s'activer complètement et dépolarise progressivement le potentiel membranaire. Dans le cas d'un courant dépolarisant, la fraction des canaux qui étaient ouverts au potentiel de repos s'inactive progressivement, hyperpolarisant ainsi le motoneurone. L'activation du courant I_h est lente, avec une constante de temps de 10 à 50ms (Powers & Binder 2001; McLarnon 1995). Ceci lui confère des propriétés de filtrage des événements synaptiques à basse fréquence en s'opposant aux variations de potentiel membranaire avec une certaine

latence. A l'inverse, du fait de ses propriétés résistive et capacitive, la membrane du neurone a une impédance qui décline pour les hautes fréquences. La combinaison du courant I_h , créant un filtre passe-haut, et des propriétés passives du motoneurone, créant un filtre passe-bas, induit un pic dans la courbe d'impédance du neurone. Cette propriété confère au motoneurone une « résonance membranaire » pour les événements synaptiques de fréquence intermédiaire au alentour de 11Hz chez le chat (Manuel et al. 2007) et 17Hz chez la souris en moyenne (Figure 3B et C; (Manuel et al. 2009). Son potentiel membranaire sera plus sensible aux courants synaptiques dans cette gamme de fréquence.

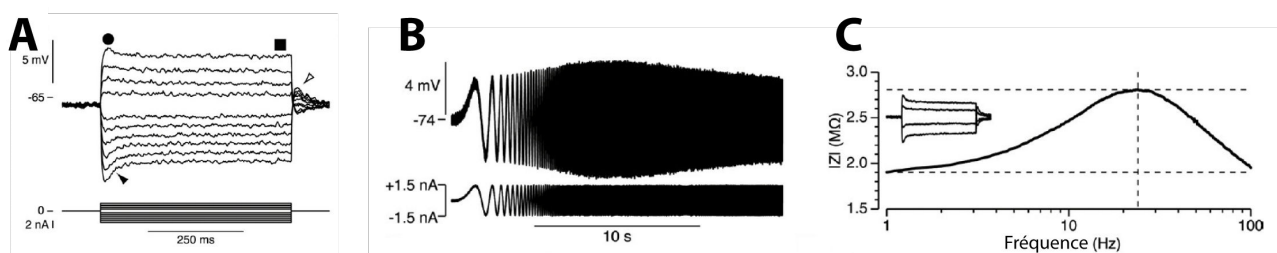


Figure 3 : Mise en évidence du courant de fléchissement et résonance membranaire des motoneurones. A. réponse moyenne du potentiel d'un motoneurones (traces du haut) en réponse à l'injection d'une série de créneaux de courants hyperpolarisants et dépolarisants (traces du bas). La flèche pleine pointe le fléchissement du voltage causé par l'activation du courant I_h au début de la réponse. La flèche évidée montre le rebond du potentiel observé à l'interruption du créneau. B. Réponse en voltage d'un motoneurone (trace du haut) à l'injection d'un courant sinusoïdal (trace du bas) de fréquence croissante (0-100Hz) et d'amplitude constante ($\pm 1,5$ nA). C. Courbe d'impédance correspondante (module de l'impédance en fonction de la fréquence du courant sinusoïdal injecté). La ligne pointillée verticale indique la fréquence de résonance (24Hz). Adaptée de Manuel et al. 2009.

Tous les motoneurones n'expriment pas la même quantité de courant I_h . L'amplitude du « sag », qui dépend de la conductance du courant I_h , est très différente selon le type physiologique des motoneurones. Les motoneurones F présentent un « sag » important alors que les motoneurones S n'en présentent peu ou pas (Gustafsson & Pinter 1984a; Zengel et al. 1985; Manuel et al. 2005). La quantité plus importante de canaux HCN ouverts au repos dans les motoneurones F contribue donc à leur faible résistance d'entrée. De cette façon, le courant I_h élargit la gamme de résistance entre les plus petits et les plus gros motoneurones et contribue aux mécanismes qui fondent le « principe de taille ». Malgré cela, le rôle physiologique du courant I_h est encore discuté. Il s'oppose aux variations du potentiel membranaire du motoneurone et a donc pour fonction de stabiliser son potentiel de repos (Ito and Oshima 1965). Il pourrait également apporter

au motoneurone des propriétés rythmiques, responsable de l'oscillation entre périodes d'hyperpolarisation et de dépolarisation qui pourraient être impliquée dans l'activité locomotrice. On enregistre en effet un « rebond » du potentiel membranaire à l'arrêt d'un créneau de courant hyperpolarisant (correspondant à l'inactivation lente du courant, [Figure 3A](#)). Dans un cas plus physiologique, l'hyperpolarisation causée par l'activation de synapses inhibitrices pourrait être suivie d'un « rebond » allant jusqu'à la décharge du motoneurone (Bertrand & Cazalets 1998). Des travaux rapportent également que l'activation du courant I_h limiterait en durée et en intensité les phases d'inactivation des motoneurones lors de l'activité locomotrice (Kiehn et al. 2000).

D / courant d' afterhyperpolarisation (AHP)

Lorsque les courants synaptiques dépolarisent suffisamment le motoneurone, celui-ci génère un potentiel d'action. Les conductances responsables de ces potentiels d'action ont été décryptées dès les premiers enregistrements de motoneurones en voltage imposé. Ces enregistrements font états d'un courant entrant rapide responsable de la phase de dépolarisation du potentiel d'action, suivi d'un courant sortant responsable de sa repolarisation (Araki & Terzuolo 1962; Nelson & Frank 1964). Les travaux de Barrett (Barrett et al. 1980; Barrett & Crill 1980) ont par la suite permis de décrire ces mécanismes plus en détail: le courant dépolarisant provient d'une conductance sodique à inactivation rapide, sensible à la tétrodothine et le courant hyperpolarisant est médié par une conductance potassique à rectification retardée. Les potentiels d'action sont également suivis par une phase d'hyperpolarisation plus lente et de grande amplitude (Brock et al. 1952; Coombs et al. 1957; Eccles et al. 1958) appelée « afterhyperpolarisation » (AHP). De nombreux modèles théoriques ont été créés afin de modéliser la décharge répétitive des motoneurones (Kernell 1968; Kernell & Sjöholm 1973; Baldissera & Gustafsson 1974a; b; Traub 1977; Traub & Llinás 1977). Dans ces modèles, les potentiels d'action sont déclenchés lorsque le potentiel membranaire dépasse un certain seuil de voltage et la trajectoire du voltage après le potentiel d'action dépend principalement des conductances de fuite et des conductances potassiques lentes responsables de l'AHP. A chaque fois, la conductance d'AHP a été décrite par ces modèles comme un facteur important de la régulation de la décharge du motoneurone.

Le courant d'AHP est un courant potassique dont l'activation est indépendante du voltage mais dépend de l'entrée de calcium dans le neurone (McLarnon 1995; Rekling et al. 2000). Il est réduit en absence de calcium extracellulaire (Viana et al. 1993a) ou lorsque les conductances calciques sont bloquées par des cations bivalents (Hounsgaard & Mintz 1988; Nishimura et al. 1989; Chandler et al. 1994). De la même façon, l'injection dans le motoneurone de chélateurs de calcium comme l'EGTA ou le BAPTA par iontophorèse le réduisent drastiquement (Krnjević et al. 1978; Zhang & Krnjević 1988; Viana et al. 1993a). Il a été montré que l'application extracellulaire d'apamine permet également de bloquer complètement ce courant d'AHP dans les motoneurons spinaux de chat (Zhang & Krnjević 1987), les motoneurons trigéminaux de cochon d'Inde (Chandler et al. 1994) ou les motoneurons trigéminaux de rats nouveau-nés (Viana et al. 1993a). Cette sensibilité à l'apamine indique que le courant d'AHP est médié par les canaux potassiques SK (*Small* potassium, en comparaison des canaux BK, *Big* potassium; Rudy 1988) de faible conductance unitaire inférieure à 20pS (Zhang & Krnjević 1986; Viana et al. 1993a; Chandler et al. 1994; Kobayashi et al. 1997). Il a été démontré dans les motoneurons hypoglossaux de rats nouveau-nés que l'entrée de calcium responsable de l'activation du courant d'AHP pendant la décharge se faisait uniquement par des canaux calciques à haut seuil de types « N » et « P », recrutés lors de la phase de dépolarisation des potentiels d'action et sensibles à l'omega-conotoxin et à l'omega-agatoxine (Viana et al. 1993B ; Umemiya & Berger 1994). L'insensibilité de la conductance d'AHP au blocage des autres types de canaux calciques suggère que l'activation des canaux SK est dépendante de concentrations calciques très locales et qu'il existe une forte proximité entre eux et les canaux calciques « N » et « P » dans les motoneurons. La relaxation de la conductance d'AHP peut se décrire par une fonction quasi-exponentielle ne dépendant que du temps (Baldissera & Gustafsson 1974b). L'évolution de cette exponentielle est liée à la constante de temps de fixation du calcium sur les canaux SK mais surtout aux dynamiques du calcium intracellulaire dont sa diffusion, son excrétion hors de la cellule et sa fixation par les tampons calciques (Sah 1996; Abel et al. 2004). Bien qu'environ 98% des ions calcium intracellulaires semblent être liés aux molécules tampons dans les neurones (Lips & Keller 1998; Palecek et al. 1999), la concentration intracellulaire de ces tampons calciques est relativement basse dans les motoneurons par rapport à d'autres cellules de même taille (Lips & Keller 1998). Or l'amplitude et la relaxation des influx calciques intracellulaires sont directement proportionnelles aux capacités de tampon des cellules (Neher 1995); il a donc été proposé par Lips & Keller (1998) que la faible capacité

en tampons des motoneurones était responsable d'événements calciques de grande amplitude mais possédant une relaxation très rapide lors d'une décharge rythmique. Ceci est incompatible avec la cinétique lente de l'AHP observée dans les motoneurones et suggère que des mécanismes indépendants du calcium (conductances potassiques NA^+ dépendantes par exemple) pourraient participer à cette cinétique (Andrade et al. 2012).

Les caractéristiques de l'AHP sont très hétérogènes parmi les motoneurones: chez le chat, son amplitude est comprise entre 1 et 20mV, sa durée varie de 40 à 200ms (Gustafsson & Pinter 1984ab; Zengel et al. 1985; Manuel et al. 2005) et sa conductance de 0.3 à 1.4 μ S (Manuel et al. 2005). Ces paramètres sont en réalité répartis selon la taille des motoneurones (Zwaagstra & Kernell 1980) et leur type physiologique (Kernell 1983). L'amplitude de l'AHP est en moyenne plus importante pour les motoneurones de type S (4.9 ± 0.6 mV), intermédiaire pour les motoneurones FR (4.3 ± 0.4 mV) et plus faible pour les motoneurones FF (3.0 ± 0.2 mV) (Zengel et al. 1985). De la même façon, la durée de l'AHP est fortement corrélée aux valeurs de résistance d'entrée des neurones (Gustafsson & Pinter 1984a). La raison de ces différences dans les caractéristiques de l'AHP n'est pas connue avec précision. Gustafsson & Pinter (1985) ont suggéré que la cinétique de la conductance d'AHP soit la même pour tous les motoneurones mais que la plus grande conductance I_h des motoneurones F leur procure un courant entrant qui diminue la durée de l'AHP. Cependant cette théorie n'explique pas les différences d'AHP mesurées lors d'un train de potentiels d'action alors même que la conductance I_h est en grande partie inactivée par la dépolarisation. Il a également été montré que la cinétique du courant I_h n'était pas assez rapide pour affecter la conductance d'AHP (Manuel et al. 2005). Ces différences pourraient finalement être dues à une hétérogénéité, selon le type physiologique du motoneurone, des concentrations en tampons calciques.

Le contrôle des paramètres de décharge des motoneurones est extrêmement important puisque la fréquence de cette décharge va déterminer la force que va produire l'unité motrice. Les facteurs qui définissent les fréquences de décharge des unités motrices sont de fait intimement corrélés aux propriétés contractiles de leurs fibres musculaires. Comme vu plus haut, la durée de l'AHP varie entre les différents types de motoneurones. Ces variations jouent un rôle fonctionnel important dans le contrôle de la décharge puisque l'AHP définit une période réfractaire après chaque potentiel d'action en éloignant le potentiel membranaire de son seuil d'activation. Le groupe de Kernell a

montré chez le chat que lorsqu'un faible courant était appliqué au motoneurone pour atteindre la décharge répétée de fréquence minimale, l'intervalle entre chaque potentiel d'action était égal à la durée de l'AHP (Kernell 1965). Les motoneurones S, possédant un AHP plus longue, ont donc une fréquence minimale de décharge plus basse que celle des motoneurones F, ce qui correspond aux propriétés biomécaniques de leurs fibres musculaires (Kernell 2006). Lors de l'injection d'un créneau de courant, on observe que les intervalles entre les premiers potentiels d'action sont plus courts que les intervalles suivants et que l'amplitude de ces potentiels d'action diminue dans le même temps (Figure 4A) Ce phénomène d'adaptation rapide de la fréquence de décharge a été décrit aussi bien dans les préparations *in vivo* (Granit et al. 1963) qu'*in vitro* (Mosfeldt-Laursen & Reklings 1989; Chandler et al. 1994). Les travaux d'Ito & Oshima (1965) montrent que ce phénomène est en partie lié à une sommation des courants d'AHP: lors du premier potentiel d'action, seule une fraction du courant d'AHP est recruté; lors du second potentiel d'action une autre fraction est recrutée se sommant à la première et retardant d'autant plus le troisième potentiel d'action et ainsi de suite jusqu'à atteindre une amplitude stable du courant d'AHP et une fréquence stationnaire de décharge. D'autres conductances contribuent probablement aussi à cette adaptation rapide de la fréquence de décharge: Miles et al. (2005) suggèrent qu'une inactivation lente des canaux sodiques responsables des potentiels d'action serait également à l'œuvre et expliquerait la diminution d'amplitude des potentiels d'action concomitante à la diminution de leur fréquence. Une fois la phase stationnaire atteinte, la fréquence de décharge des motoneurones est particulièrement stable. Burke a montré (1970) que cette caractéristique était particulièrement importante pour la physiologie des unités motrices puisque la force produite par les fibres musculaires pouvait être profondément altérée même par de petites variations de la fréquence de décharge. Le blocage des conductances d'AHP augmente la fréquence de décharge mais rend aussi la décharge très irrégulière (Figure 4C) prouvant l'importance de l'AHP dans la régularisation de la décharge (Manuel et al. 2006).

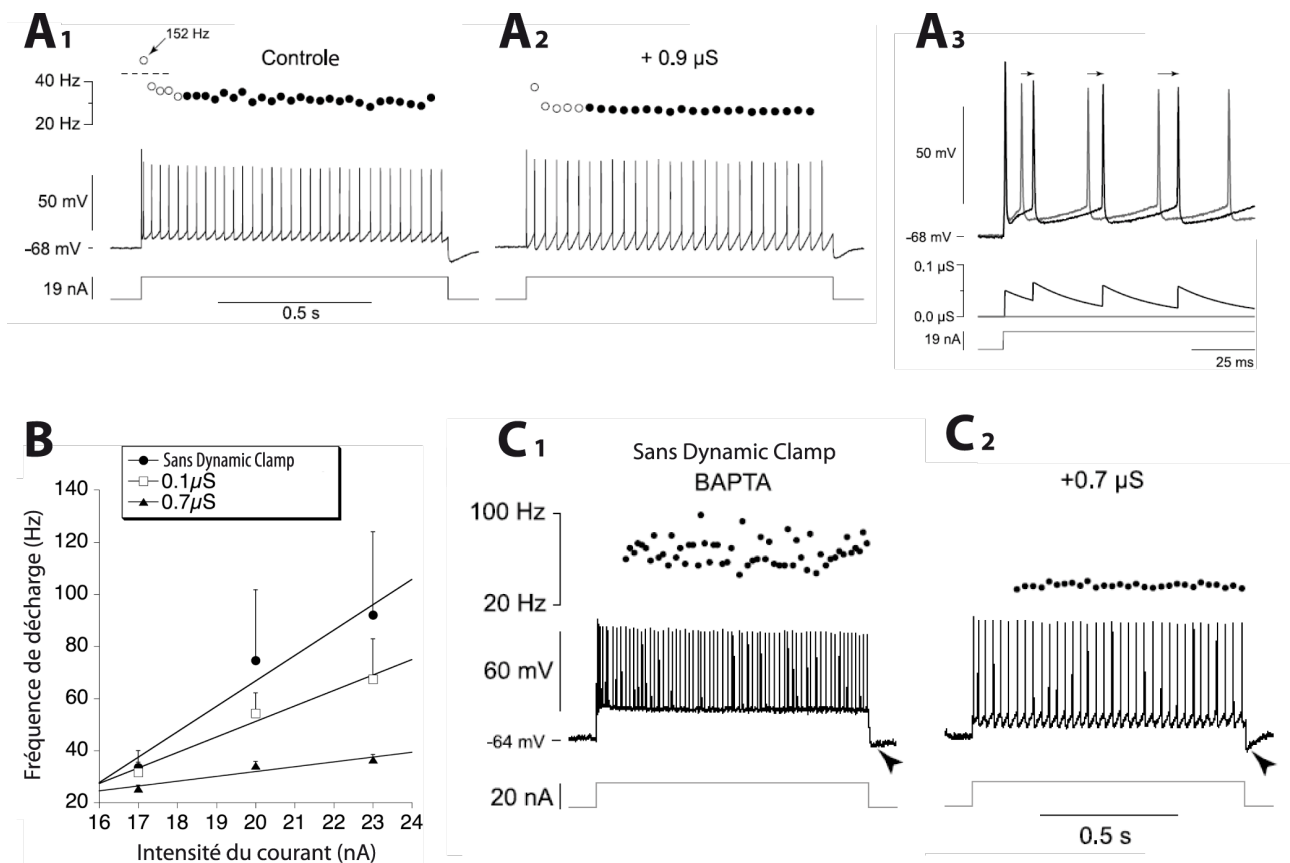


Figure 4 : Effets de l'AHP sur la fréquence de décharge. A1. Décharge d'un motoneurone de chat anesthésié (trace du milieu) et fréquence instantanée (trace du haut) en réponse à l'injection d'un créneau de courant dépolarisant (trace du bas). A2. Réponse du même motoneurone lorsque sa conductance d'AHP est augmentée par *Dynamic clamp* de 0,9 μ S. Notez que la fréquence de décharge est réduite, notamment pour les premiers potentiels d'action (symboles vides), et plus stable qu'en condition contrôle. A3. Agrandissement du début de la décharge en condition contrôle (trace fine) et après augmentation de la conductance d'AHP par *Dynamic clamp* de 0,1 μ S (trace épaisse). La trace du milieu montre la sommation temporelle de la conductance d'AHP imposée par *Dynamic clamp*. Les flèches indiquent les elongations des intervalles entre les premiers potentiels d'action. B. Relations courant-fréquence pour différentes valeurs de conductance d'AHP. Les fréquences moyennes de décharge ont été mesurées sur la partie stationnaire de la décharge (symboles pleins des fréquencesgrammes en A) en réponse à des créneaux de courants dépolarisants de différentes intensités. C1. Décharge d'un motoneurone en réponse à l'injection d'un créneau de courant dépolarisant et en présence de BAPTA, réduisant la disponibilité du calcium nécessaire à l'ouverture des conductances d'AHP. Notez la haute fréquence et l'irrégularité de la décharge par rapport à la décharge en A1. C2. Réponse du même motoneurone lorsque sa conductance d'AHP est augmentée par *Dynamic clamp* de 0,7 μ S. La fréquence de décharge est diminuée et retrouve sa stabilité. Adaptée de Manuel et al. 2006.

Lorsqu'un courant d'amplitude croissante est appliqué dans un motoneurone (cas d'une rampe de courant), la fréquence de décharge augmente progressivement suivant une relation courant-fréquence linéaire de pente faible, définissant la « zone primaire » de décharge. La gamme de fréquence explorée au cours de la zone primaire permet la gradation progressive de la force musculaire produite par une unité motrice jusqu'à sa

valeur maximale. Comme l'ont montré les expériences de modulation pharmacologique du courant d'AHP dans le motoneurone ainsi que les modèles théoriques (Viana et al. 1993a; Hounsgaard & Mintz 1988; Nishimura et al. 1989; Sawczuk et al. 1997; Chandler et al. 1994; Meunier & Borejsza 2005; Manuel et al. 2005; 2006), la pente de la relation linéaire courant-fréquence (gain) des motoneurones dans cette zone primaire est essentiellement dirigée par l'AHP. Chez le chat, une fois une certaine fréquence atteinte la relation courant-fréquence devient moins régulière et plus pentue, zone définie comme la « zone secondaire » de décharge. Lors de la transition entre les zones primaire et secondaire, la trajectoire de la relaxation de l'AHP est modifiée suggérant qu'elle puisse y jouer un rôle (Schwindt & Calvin 1972; 1973; Schwindt 1973). Chez le chat, la durée de cette AHP est précisément adaptée aux propriétés contractiles des fibres musculaires innervées: pour chaque unité motrice, elle définit une fréquence de décharge minimale pour laquelle les contractions unitaires commencent tout juste à se sommer et, après gradation lisse et progressive, une fréquence de décharge maximale pour laquelle les contractions sont totalement fusionnées (Kernell 2006). L'AHP permet donc d'adapter la fréquence de décharge des motoneurones (Figure 4) et, par extension, d'assurer le contrôle de la force musculaire développée par les unités motrices.

E / courants entrants persistants

a) Courant entrant persistant calcique

La présence de courants entrants persistants a été décrite dès 1980 dans les motoneurones de chats anesthésiés par les travaux de Schwindt & Crill (1980a; b; c). Leur étude a été, dans un premier temps, rendue difficile par les limitations techniques de la préparation; les barbituriques utilisés alors comme anesthésiques dans les expériences *in vivo* chez le chat ont en effet la particularité de réduire considérablement les courants entrants persistants. Ce sont les préparations sur animaux décérébrés, non anesthésiés réalisés plus tardivement qui ont permis d'en faire une description plus détaillée (Conway et al. 1988; Crone et al. 1988; Hounsgaard et al. 1988). Lors d'une dépolarisation lente de la membrane, la relation courant-voltage des motoneurones arbore une forme en « N » trahissant l'ouverture de conductances entrantes (Figure 5A, Schwindt & Crill 1977; Alaburda et al. 2002). Ce courant est également responsable de dépolarisations se

maintenant sur de longues durées appelées « potentiels de plateau » et lui conférant son aspect persistant (Schwindt & Crill 1980a; c; Hounsgaard et al. 1988). De la même façon, un bref créneau de courant dépolarisant peut déclencher dans ces motoneurones une décharge se prolongeant bien au-delà de la fin de la stimulation (Figure 5C) et pouvant être stoppée par un créneau de courant hyperpolarisant. La membrane, pour un même courant imposé peut donc se trouver dans deux états stables différents: un état quiescent ou un état plus dépolarisé présentant une décharge lors de l'activation des courants entrants persistants. On retrouve cette « bistabilité » membranaire dans la courbe courant-voltage décrite précédemment: dans une certaine gamme, deux valeurs de voltage sont possibles pour un même courant. Dans cette gamme instable, une petite augmentation du courant reçu par le neurone peut faire sauter le voltage de son état bas vers l'état plus dépolarisé (Figure 5B).

Il a été montré dans le motoneurone de tortue que ces courants entrants persistants sont en grande partie d'origine calcique et transitent par les canaux ioniques de type « L » (Hounsgaard & Mintz 1988). Ils ont été par la suite décrits de façon similaire dans les motoneurones de souris (Carlin et al. 2000a; b), cobaye (Nishimura et al. 1989, Hsiao et al. 1998)(Nishimura et al. 1989; Hsiao et al. 1998), rat (Li et al. 2004) et chat (Schwindt and Crill 1980a; c). Plusieurs arguments soutiennent une localisation dendritique de ces canaux. Les modèles théoriques ont suggéré que le courant entrant persistant enregistré au soma était mieux expliqué par la présence d'une relation courant-voltage en « N » exhibée par la membrane sur la totalité de l'arborisation dendritique (Gutman 1971; 1991; Butrimas & Gutman 1978). La dépolarisation appliquée au soma serait alors suffisante pour activer le courant entrant persistant jusque dans les dendrites distales, mais la repolarisation somatique insuffisante pour faire quitter l'état dépolarisé stable des membranes dendritiques. En conséquence, le courant entrant serait enregistré de manière prolongée au soma (Figure 5C). De plus, lorsqu'une rampe de voltage est imposée au soma du motoneurone, le courant enregistré arbore un comportement asymétrique, dit « hystérétique », entre la branche ascendante et descendante, ce qui renforce l'hypothèse de la localisation dendritique du courant (Figure 5D; Lee and Heckman 1999; Carlin et al. 2000b). L'amplitude du courant entrant persistant est plus importante et son seuil d'inactivation plus bas sur la branche descendante que sur la branche ascendante de la rampe. Enfin, les entrées synaptiques *I_a*, localisées sur l'arborisation dendritique, sont amplifiées par la dépolarisation du motoneurone, malgré la

plus grande proximité du potentiel d'inversion sodique (Bennett et al. 1998). Ceci suggère l'implication de conductances dendritiques produisant un courant entrant supplémentaire qui correspondrait au courant entrant persistant. La localisation des canaux ioniques responsables de ce courant a par la suite été confirmée sur l'ensemble de l'arborisation des motoneurones ainsi que sur leur soma par immunohistochimie (Carlin et al. 2000b; Simon et al. 2003). Les « potentiels de plateaux » et la « bistabilité » du potentiel membranaire dont est responsable ce courant peuvent maintenir le motoneurone dans un état plus dépolarisé de manière prolongée et permettent une amplification des entrées synaptiques. De cette façon, les courants synaptiques peuvent plus facilement atteindre le seuil en voltage des potentiels d'action et le motoneurone peut atteindre de hautes fréquences de décharge plus facilement (Lee and Heckman 1996; 1998a; b; 2000; Bennett et al. 1998; Hultborn et al. 2003).

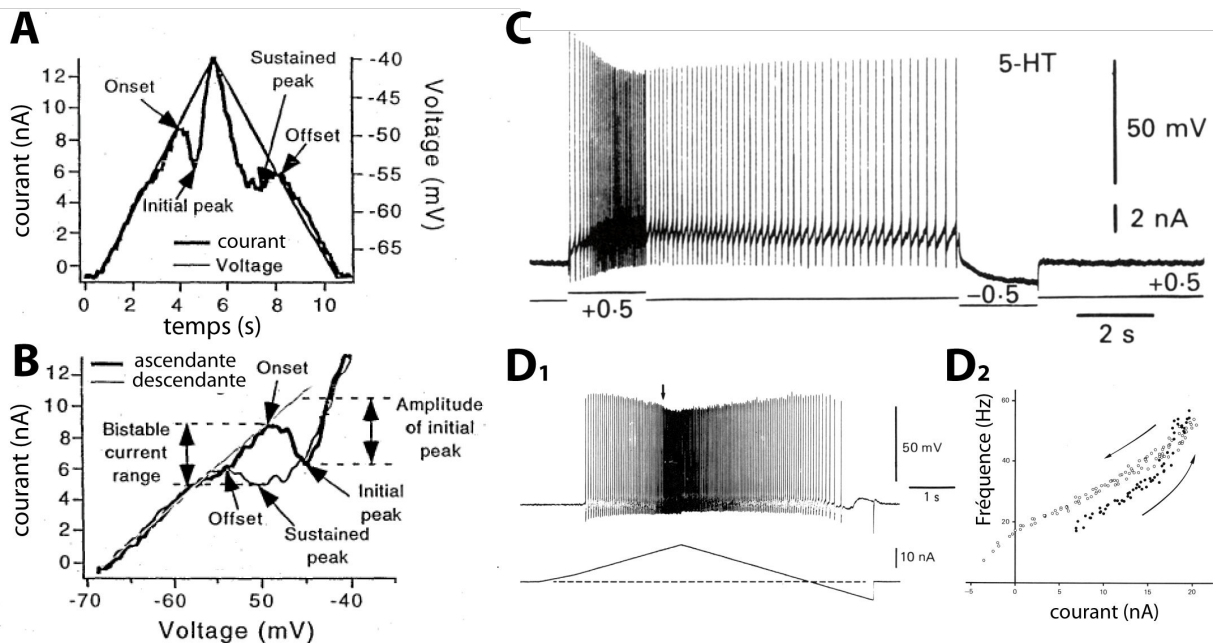


Figure 5 : Courants entrants persistants dans les motoneurones et effets sur la décharge. A. Courant membranaire d'un motoneurone en réponse à l'application d'une rampe triangulaire de voltage. B. Relation courant-voltage de la trace en A. Le tracé épais correspond à cette relation sur la branche ascendante de la rampe de voltage, le tracé fin à la branche descendante. L'activation des courants entrants persistants est définie par le point pour lequel la pente du courant devient nulle sur la branche ascendante et sa désactivation est définie par le dernier point de pente nulle sur la branche descendante. L'amplitude des courants entrants persistants est mesurée par la différence entre le courant enregistré au pic initial et le courant prédit par les conductances de fuite. La « bistabilité » de la membrane prend place dans la gamme de courant comprise entre ceux d'activation et d'inactivation des courants entrants persistants. C. Effets des courants entrants persistants sur la décharge. Un créneau de courant (trace du bas) initie la décharge (trace du haut) qui s'accélère durant le créneau et se prolonge après son arrêt, révélant la « bistabilité ». un créneau de courant hyperpolarisant est nécessaire pour stopper la décharge. D1. Décharge (trace du haut) en réponse à l'injection d'une rampe triangulaire de courant (trace du bas). La flèche pointe une accélération de la décharge sur la branche ascendante. La décharge est plus longue sur la rampe descendante qu'elle ne l'était sur la branche ascendante et un courant négatif est nécessaire pour la stopper. D2. Relation courant fréquence de la décharge. La courbe montre une hystérésis dans le sens anti-horaire entre la branche ascendante (points noirs) et la branche descendante (points blancs). A et B adaptées de Lee & Heckman 1999. C adaptée de Hounsgaard & Kiehn 1989. D adaptée de Hounsgaard et al. 1988.

b) Courant entrant persistant sodique

Plus tardivement, un autre courant entrant persistant, d'origine sodique cette fois-ci, a été décrit dans les motoneurones. Il contribuerait à la forme en « N » de la relation courant-voltage des motoneurones et a été décrit dans les motoneurones trigéminaux de cobaye (Hsiao et al. 1998), hypoglossaux de rats nouveau-nés (Powers & Binder 2003) et spinaux de rat (Li & Bennett 2003) où il peut représenter jusqu'à 50% de la totalité des courants entrants persistants. Son origine est encore incertaine mais il pourrait provenir d'une fraction des canaux sodiques transitoires responsables de la dépolarisation des potentiels d'action. Le modèle d'Hodgkin-Huxley prévoit en effet un courant de fenêtre pour ces canaux sur une gamme de potentiel qui correspondrait à celle de l'activation du

courant sodique persistant (Hodgkin & Huxley 1952). Il a toutefois été mesuré des « fenêtres » plus grandes et un potentiel d'activation plus hyperpolarisé pour le courant sodique persistant que ceux prédits pour le courant transitoire. Ceci évoque l'existence d'un type de canaux supplémentaire médiant ce courant, à la fois sur les motoneurones (Li & Bennett 2003) et sur d'autres types neuronaux l'exprimant (French et al. 1990). Ce courant est actif dans la même gamme de potentiels que le courant entrant persistant calcique (Hsiao et al. 1998; Li & Bennett 2003) ou à des potentiels légèrement plus hyperpolarisés (Powers & Binder 2003) mais sa cinétique est plus rapide. Le courant sodique persistant s'active de manière instantanée alors que le courant calcique persistant possède une constante de temps d'activation lente (Crill 1996; Li et al. 2004). Cette cinétique rapide conférerait au courant sodique persistant un rôle important dans l'initiation des potentiels d'action et le maintien de la décharge (Lee & Heckman 2001; Harvey et al. 2006a; b).

Contrairement à ceux des mammifères, les motoneurones de tortues ne semblent pas posséder de courant persistant purement sodique. Ils possèdent toutefois un courant cationique non spécifique (I_{CAN}) qui pourrait tenir le même rôle que le courant sodique persistant et dont l'activation est dépendante du calcium. L'entrée de calcium via les canaux de type « L » permettrait l'activation de ce courant qui participerait ainsi au courant entrant persistant total. La grande majorité des motoneurones semblent exprimer un courant entrant persistant, suggérant sa présence quelque soit le type physiologique de l'unité motrice. Toutefois, dans les préparations de chat décérébré qui permettent de s'affranchir de l'anesthésie pour révéler ces courants, Lee & Heckman (1998a; 1999) ont constaté que tous les motoneurones ne présentent pas de bistabilité parfaite. 35% d'entre eux seulement étaient capables de soutenir une bistabilité « complète » sur de longues durées alors que les autres ne présentaient qu'une bistabilité « partielle » d'une durée inférieure à 3s. Ils ont montré que les motoneurones totalement bistables étaient ceux qui possédaient les rhéobases les plus petites et les vitesses de conduction axonales les plus lentes et que les motoneurones partiellement bistables avaient des potentiels d'activation et de désactivation plus dépolarisés. Ces résultats évoquent des différences dans l'expression de ces courants parmi la population de motoneurones selon leur type physiologique (Lee & Heckman 1998a; 1999). Ils sont exprimés en plus grande quantité dans les motoneurones S, les premiers à être recrutés et renforcent donc le principe de la taille mentionné plus haut (Heckman & Lee 1999).

c) Rôle physiologique des courants entrants persistants

Des travaux sur les motoneurones de chat anesthésié (Powers & Binder 1995) ainsi que des travaux théoriques (Rose & Cushing 1999) ont montré que les courants synaptiques atteignant le segment initial de l'axone, où les potentiels d'action sont émis, ne sont pas suffisants pour traduire les fréquences de décharge observées dans les motoneurones lors de l'activité locomotrice. Ceci suggère l'existence, dans les motoneurones, d'un processus permettant l'amplification des courants synaptiques. On s'accorde aujourd'hui à dire que les courants entrants persistants, calciques et sodiques, qui sont responsables d'une bistabilité du potentiel membranaire permettent cette amplification des entrées synaptiques. Les travaux du groupe de Hultborn (Bennett et al. 1998) ont en effet démontré dans les motoneurones de chat anesthésié l'amplification des courants synaptiques provenant des fibres *Ia* (Figure 6A). Dans cette expérience, le motoneurone est maintenu quiescent par l'application d'un bloqueur des canaux sodiques responsables des potentiels d'action (QX-314) et soumis à des entrées synaptiques *Ia* (réponse sensorielle provenant des fuseaux neuromusculaires) produites par l'étirement sinusoïdal du muscle qu'il innerve. Des potentiels post-synaptiques excitateurs (PPSEs) *Ia* sont enregistrés dans le motoneurone. L'amplitude de ces PPSEs augmente lorsque le motoneurone est légèrement dépolarisé, traduisant l'activation transitoire des courants entrants persistants. Lorsque le motoneurone est dépolarisé de façon plus conséquente, la totalité des canaux est activée de façon complète et le potentiel de plateau est atteint, réduisant ainsi l'amplitude effective des PPSEs. De la même façon, cette amplification voltage dépendante des PPSEs est également observée lors de la décharge du motoneurone. Lorsqu'une rampe de courant est appliquée au motoneurone sans blocage de ses potentiels d'action, sa fréquence de décharge instantanée augmente progressivement. Lors de l'étirement sinusoïdal du muscle, cette fréquence instantanée est modulée par les entrées synaptiques *Ia* du motoneurone. Lorsque la rampe de courant atteint des valeurs plus élevées, cette modulation de la fréquence instantanée s'intensifie, traduisant le recrutement des conductances entrantes persistantes (Figure 6B ; Hultborn et al. 2003). Lee & Heckman ont aussi montré que la « zone secondaire » (par opposition à la « zone primaire ») de la décharge, qui correspond à une accélération de la fréquence lorsque le courant injecté lors d'une rampe atteint des valeurs importantes, était liée à l'activation des courants entrants persistants (Lee & Heckman 1998a). Bennett a confirmé plus tard que ces courants avaient un rôle important dans l'hystérésis des relations

courant-fréquence des motoneurones (Bennett et al. 2001a). L'activation des courants entrants persistants semble requérir une facilitation monoaminergique (serotonine, neuroépinéphrine) provenant du tronc cérébral (Conway et al. 1988; Hounsgaard et al. 1988). Chez le rat, après spinalisation aigüe, ces courants entrants persistants sont donc largement déprimés. Dans ces conditions, la relation courant-fréquence des motoneurones a un comportement hystérétique dans le sens horaire. Chez les rats spinaux chroniques, les courants entrants persistants ré-émergent au bout de quelques semaines et sont responsables d'une spasticité musculaire (Bennett et al. 2001b). Les motoneurones enregistrés chez ces animaux montraient cette fois ci une hystérésis dans le sens anti-horaire.

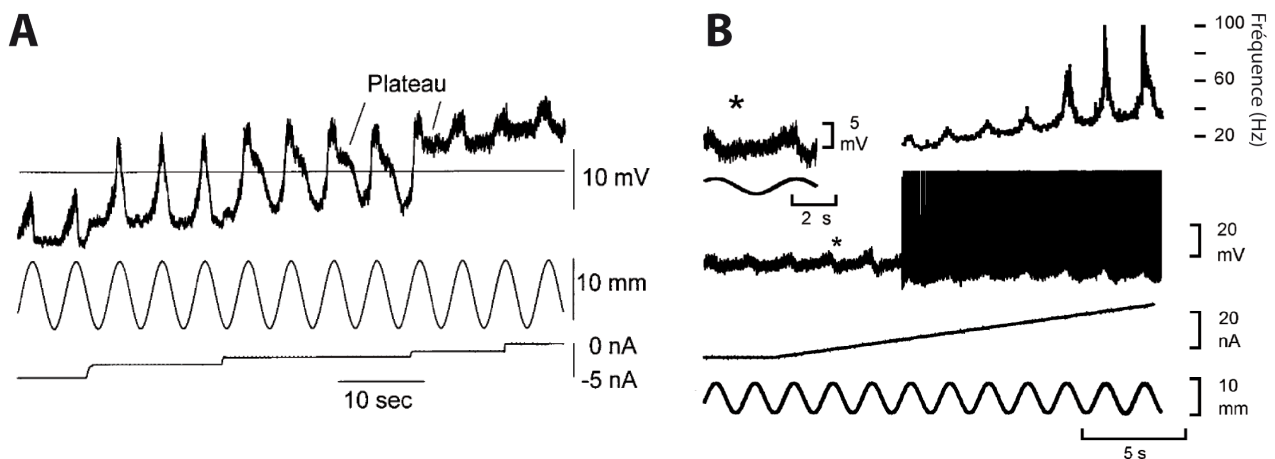


Figure 6 : Amplification de l'entrée synaptique Ia par les courants entrants persistants. A. Enregistrement du potentiel membranaire (trace du haut) d'un motoneurone du triceps sural de chat décérébré dans lequel l'émission des potentiels d'action est bloquée par le QX-314. Le motoneurone reçoit des entrées synaptiques Ia générées par l'étirement sinusoïdal du muscle (trace du milieu). Le potentiel est initialement maintenu hyperpolarisé par l'injection d'un courant négatif au soma, puis progressivement dépolarisé en réduisant ce courant par paliers (trace du bas). Par rapport à la situation hyperpolarisée initiale, une faible dépolarisation produit une forte augmentation de l'amplitude des PPSEs pouvant aller jusqu'à l'activation partielle d'un potentiel de plateau. Lorsque la dépolarisation se poursuit, le potentiel de plateau s'active complètement et provoque une diminution importante de l'amplitude des PPSEs. B. Fréquence de décharge (premier tracé en haut) et potentiel membranaire (deuxième tracé) d'un motoneurone du triceps sural de chat décérébré soumis à la fois à une rampe de courant imposée au soma (troisième tracé) et à une activité synaptique Ia générée par l'étirement sinusoïdal du muscle (quatrième tracé en bas). L'étirement du muscle entraîne l'apparition de PPSEs (* et agrandissement) qui vont moduler la fréquence de décharge du motoneurone une fois son seuil atteint. Pour une certaine quantité de courant injecté, cette modulation de la fréquence instantanée augmente de façon brutale. Cet effet est attribué au recrutement des courants entrants persistants par la dépolarisation graduelle des dendrites. A adaptée de Bennett et al. 1998. B adaptée de Hultborn et al. 2003.

L'activation des courants entrants persistants a été majoritairement observée en « tout ou rien ». Or pour une amplification graduelle des entrées synaptiques, une activation progressive des courants persistants est plus cohérente. Cette amplification graduelle des courants synaptiques peut toutefois être obtenue par l'activation de façon

indépendante de populations de canaux ségrégués dans des segments dendritiques distincts (R. H. Lee et al. 2003; Bui et al. 2006). L'amplification des courants synaptiques lents a jusqu'à maintenant été étudiée de manière intensive, mais les courants sodiques persistants pourraient permettre l'amplification des courants plus rapides (Jones & Lee 2006). En effet, la différence de cinétique entre les deux courants entrants persistants (calcique et sodique) permet aux motoneurones d'amplifier des entrées synaptiques différentes. Par exemple, les entrées synaptiques proprioceptives *Ia* sur le motoneurone possèdent deux composantes, une statique codant la longueur du muscle et une dynamique codant ses variations (cf. Introduction). Le courant sodique persistant est capable d'amplifier la résonance sous-seuil créée par le courant I_h (cf plus haut) (Manuel et al. 2007). De cette façon, il amplifie préférentiellement les entrées synaptiques dynamiques des motoneurones F, possédant une forte résonance (Figure 7). De cette façon les motoneurones F seront recrutés lors d'une variation de la longueur du muscle pour, par exemple, rétablir l'équilibre. Par opposition, le courant entrant calcique amplifie les entrées synaptiques à basses fréquences en réduisant la résonance sous-seuil liée au courant I_h . Dans les motoneurones S, peu résonants, le courant sodique persistant pourra amplifier les entrées synaptiques statiques et faciliter son recrutement lors de l'activité posturale (Figure 7) (Manuel et al. 2007). De cette façon, le motoneurone sera plus sensible aux entrées synaptiques qui correspondent à sa fonction physiologique.

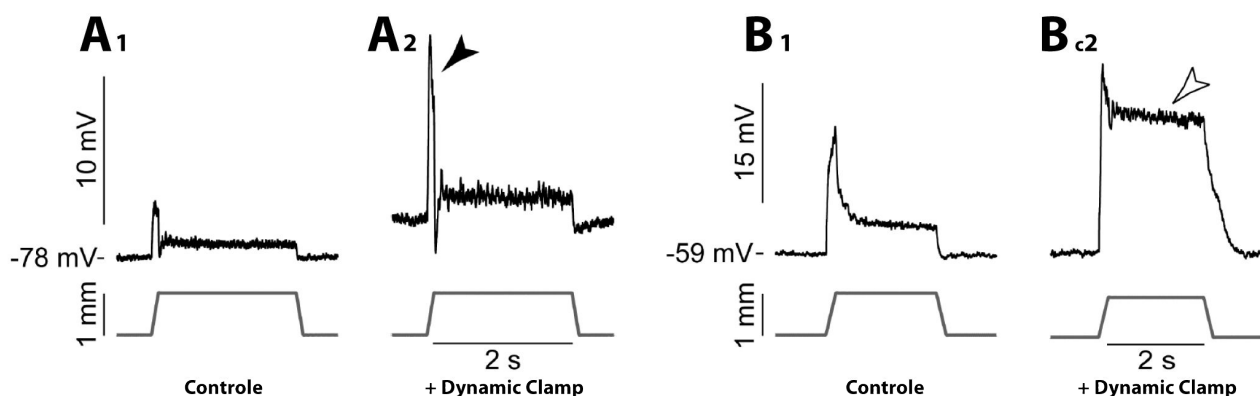


Figure 7 : Amplification différentielle dans les motoneurones résonants et non-résonants. A1. Enregistrement du potentiel (trace du haut) d'un motoneurone (probablement de type F) du triceps sural possédant une forte résonance sous-seuil à l'étirement prolongé du muscle (trace du bas). A2. Lorsqu'un courant entrant persistant rapide artificiel est ajouté par *Dynamic clamp*, la réponse dynamique du potentiel à l'étirement musculaire est amplifiée (flèche pleine). B1. Réponse du potentiel membranaire d'un motoneurone non-résonant (probablement de type S) à l'étirement musculaire. B2. Lorsqu'un courant entrant persistant rapide artificiel est ajouté par *Dynamic clamp*, toutes les composantes de la réponse sont amplifiées, notamment la composante statique par déclenchement d'un plateau de potentiel (flèche vide). Adaptée de Manuel et al. 2007.

F / Variations du seuil des potentiels d'action au cours de la décharge

Le voltage membranaire pour lequel les potentiels d'action sont initiés dépend en partie de l'état d'activation et d'inactivation des canaux sodiques présents sur le soma, le cône de l'axone et son segment initial. La cinétique et la dépendance au voltage de ces processus d'activation/inactivation ont été décrits dans les motoneurones comme ressemblant beaucoup à ceux étudiés par Hodgkin & Huxley (1952) dans l'axone géant de calamar (Barrett & Crill 1980; Schwindt & Crill 1982). La valeur du courant de recrutement d'un motoneurone soumis à une rampe dépend de la vitesse de cette dernière : Le courant nécessaire pour le faire décharger sera d'autant plus important que la rampe est lente. Ce phénomène est connu sous le nom d'accommodation (Burke & Nelson 1971; Schlue et al. 1974a; b) et semble être causé par une légère inactivation sodique sous-seuil (Frankenhaeuser & Vallbo 1965; Vallbo 1964; Schlue et al. 1974c; Kernell 2006). Les expériences sur l'axone moteur de chat ont montré que la constante de temps d'inactivation sodique était de l'ordre de 2 à 4ms (Richter et al. 1974). La dépendance au voltage et la cinétique de cette inactivation sodique suggèrent que le seuil d'activation des potentiels d'action devrait également varier lors de la relaxation de l'AHP (0.1-0.2mV/ms) entre deux potentiels d'action (Schwindt & Calvin 1972). Ce phénomène a été démontré expérimentalement par l'injection de brèves stimulations à différents points durant l'intervalle entre les potentiels d'action (Figure 8A; Calvin & Stevens 1968; Calvin 1974; Powers & Binder 1996; 1999). Le seuil en voltage varie pendant cet intervalle en suivant la trajectoire de la relaxation de l'AHP. Lorsqu'un créneau hyperpolarisant est appliqué avant la décharge, son seuil est également hyperpolarisé, démontrant la dé-inactivation du courant sodique lorsque le potentiel membranaire s'éloigne du seuil de décharge (Figure 8B).

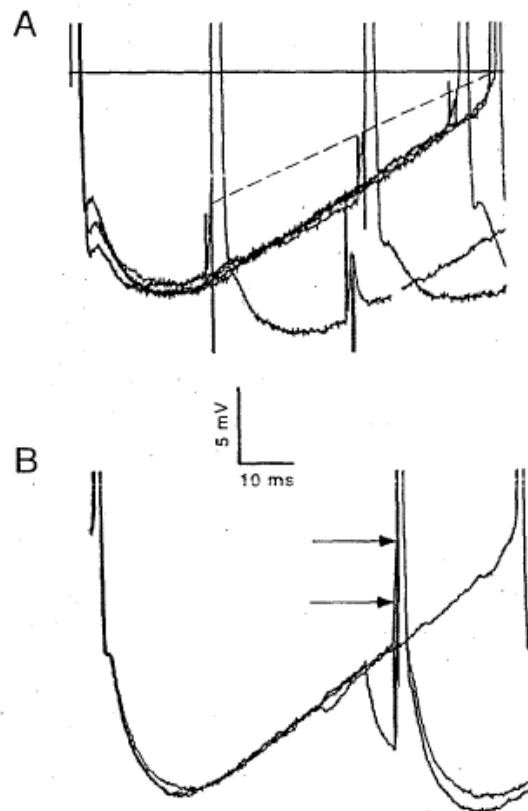


Figure 8 : Variation du seuil des potentiels d'action durant la décharge répétitive. A. superposition de quatre tracés d'intervalles entre les potentiels d'action lors de la décharge répétitive d'un motoneurone lombaire de chat. Sur trois d'entre eux, une stimulation est délivrée avec un délai différent par rapport au potentiel d'action précédent. La ligne pointillée montre que le seuil en voltage des potentiels d'action varie au cours de la relaxation de l'AHP. B. Enregistrement similaire pour un autre motoneurone de chat. Pour deux des trois traces une stimulation est appliquée, précédée ou non d'un créneau de courant hyperpolarisant. Le seuil du potentiel d'action est abaissée après le créneau hyperpolarisant (flèche du bas) par rapport à la trace sans créneau (flèche du haut). Adaptée de Powers and Binder 1999.

Des processus plus lents d'inactivation des courants sodiques ont été décrits dans de nombreux types cellulaires (Brismar 1977; Rudy 1981; Howe & Ritchie 1992; Fleidervish et al. 1996; Jung et al. 1997). Les cinétiques de ces inactivations lentes sont telles que seule une petite fraction des courants sodiques sont inactivés lors d'un potentiel d'action unique (Colbert et al. 1997; Junget al. 1997). Cependant, la dé-inactivation lente permet une accumulation de l'inactivation pendant une décharge répétitive prolongée (Colbert et al. 1997; Jung et al. 1997). Cette accumulation peut expliquer la dépolarisation progressive du seuil pendant la décharge de certains neurones (Schwindt & Crill 1982). Cette augmentation du seuil est accompagnée par une augmentation du niveau de dépolarisation moyen de la membrane entraînant une augmentation du recrutement des courants entrant persistants.

La transmission de l'information entre neurones se fait de manière générale à la synapse par la libération présynaptique de neurotransmetteurs qui vont ouvrir des canaux ioniques en se liant spécifiquement aux récepteurs postsynaptiques. Les propriétés sous-seuil et de décharge des motoneurones peuvent toutefois être influencées par la neuromodulation. Certains neurotransmetteurs peuvent se lier à une autre catégorie de récepteurs, les récepteurs métabotropiques. L'activation de ces récepteurs déclenche des cascades intracellulaires de seconds messagers qui vont avoir des effets variés sur l'ouverture de certains canaux ou la sensibilité de certains récepteurs. Les motoneurones, à la fois dans le tronc cérébral et dans la moelle épinière, sont richement innervés par ces circuits neuromodulateurs, particulièrement par les terminaisons sérotoninergiques et noradrénergiques. La sérotonine et la noradrénaline ont pour principal effet de dépolariser le potentiel membranaire des motoneurones (Elliott & Wallis 1992; Hsiao et al. 1998; Inoue et al. 1999). Cette dépolarisation est associée à une augmentation de l'excitabilité en réduisant le courant nécessaire au motoneurone pour émettre un potentiel d'action (Bayliss et al. 1992; Parkis et al. 1995; Hsiao et al. 1997). La sérotonine et la noradrénaline augmentent également la conductance du courant I_h (Takahashi 1990; Larkman & Kelly 1992; Hsiao et al. 1997) et diminuent les conductances d'AHP en inhibant les conductances calciques dont dépendent leur activation (Bayliss et al. 1995). L'effet modulateur de la sérotonine sur l'AHP dépend de l'espèce et du stade de développement de l'animal. Il est par exemple beaucoup plus important chez le cochon d'Inde juvénile (Hsiao et al. 1997) et le rat néonatal (Talley et al. 1997) que chez le rat juvénile (T. Inoue et al. 1999). Ces différences sont probablement causées par une expression différente des récepteurs à la sérotonine selon les espèces. La sérotonine a également des effets sur les courants entrants persistants exprimés par les motoneurones (Hsiao et al. 1998; Svirskis & Hounsgaard 1998; Harvey et al. 2006a). Une modulation différente des courants persistants sodiques et calciques pourrait permettre une action indépendante sur ces deux courants et une amplification différentielle des entrées synaptiques /a statiques ou dynamiques selon les différents types physiologiques de motoneurones et leurs fonctions motrices (Manuel et al. 2007). La neuromodulation des motoneurones influencent leurs relations entrée-sortie en facilitant leur décharge et en modifiant le gain de la courbe fréquence-courant (Hounsgaard & Kiehn 1989; Lindsay & Feldman 1993).

Chapitre II - Oscillations de mode mixte dans les motoneurones de souris et leur relation à l'excitabilité

Introduction

Les caractéristiques physiologiques des unités motrices diffèrent selon les espèces pour s'adapter à leurs comportements locomoteurs spécifiques. Les unités motrices de souris ont ainsi des temps de contraction beaucoup plus courts que celles de rats ou de chats (Lewis et al. 1982; Bateson & Parry 1983) et permettent des mouvements plus rapides. Ce faible temps de contraction met les motoneurones de souris dans une situation particulière où ils doivent être capables de décharger à la fois à haute fréquence pour atteindre la fusion tétanique de leurs unités motrices et à basse fréquence pour générer de petites forces. Ils requièrent donc une large gamme de fréquence de décharge. Jusqu'à récemment, les propriétés intrinsèques des motoneurones de souris, qui définissent leur décharge, restaient en grande partie méconnues du fait de limitations techniques pour produire des enregistrements *in vivo* stables. Mon équipe a été la première à réaliser ces enregistrements chez la souris adulte anesthésiée (Manuel et al. 2009) et a mis en évidence trois caractéristiques qui permettent aux motoneurones spinaux de souris cette large gamme de fréquences. Premièrement, ils ont une constante de temps membranaire plus courte (0,5-4ms) que celles des motoneurones de chats (4-14,5ms), ce qui leur octroie une fréquence de résonance plus élevée et leur permet de répondre à des entrées synaptiques à plus haute fréquence (Manuel et al. 2009). Deuxièmement, leur AHP est plus rapide et leur permet d'atteindre des fréquences de décharge plus élevées. Troisièmement, leur potentiel membranaire affiche des oscillations sous-seuil à haute fréquence (100-150Hz) entre les potentiels d'action. La cinétique rapide de leur potentiel membranaire favorise l'apparition de ces oscillations qui créent un régime de décharge particulier durant lequel les oscillations suivent l'AHP et retardent le potentiel d'action suivant un délai variable (Figure 9). Ces oscillations permettent donc une décharge à base fréquence (2-3Hz) au détriment de sa régularité (Manuel et al. 2009).

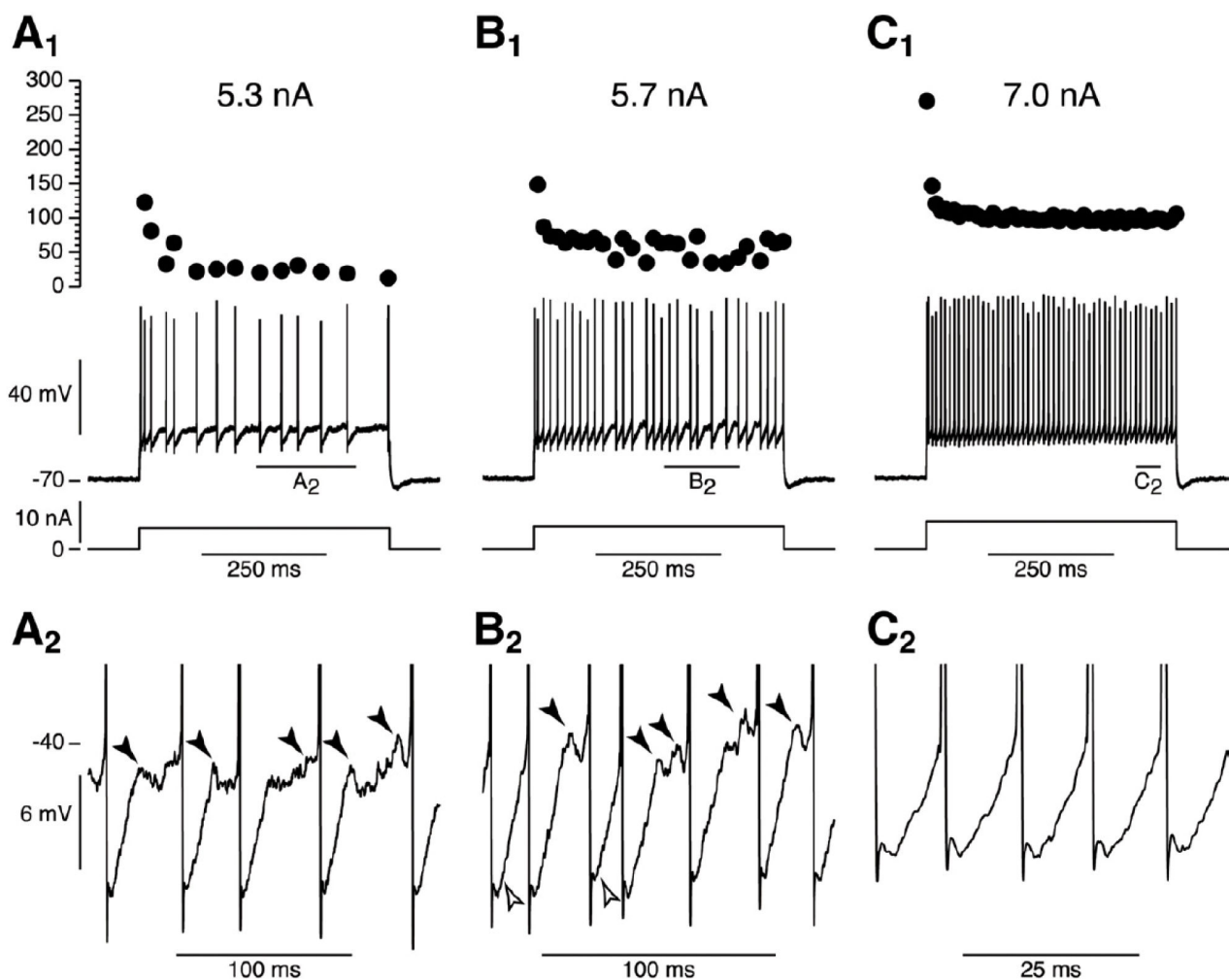


Figure 9 : Oscillations sous-seuil durant la décharge des motoneurones de souris. A1. Décharge (tracé du milieu) d'un motoneurone en réponse à l'injection d'un créneau de courant (tracé du bas) de 5,3nA. La fréquence instantanée de décharge est représentée au dessus du tracé du voltage. A2. Agrandissement de la région indiquée par la barre horizontale en A1. Les pointes de flèches noires indiquent des oscillations à haute fréquence qui prolongent les intervalles entre les potentiels d'action. B1. Même organisation qu'en A1, pour un créneau de courant de 5,7nA cette fois-ci. B2. Agrandissement de la région indiquée par la barre horizontale en B1. Les pointes de flèches noires indiquent des oscillations et les pointes de flèches blanches indiquent des intervalles entre potentiels d'action dominés par l'AHP. C1. Même organisation qu'en A1, lorsque le courant injecté est augmenté à 7,0nA. C2. Agrandissement de la région indiquée par la barre horizontale en C1. Les oscillations sont ici absentes des intervalles entre les potentiels d'action. Adaptée de Manuel et al. 2009.

De telles oscillations n'ont jamais été décrites dans les motoneurones de chats mais elles pourraient toutefois contribuer à la décharge des motoneurones de rats (Turkin et al. 2010). En réponse à une rampe de courant, le régime « sous-primaire » de décharge dont elles sont responsables s'étend jusqu'à des fréquences de décharge allant jusqu'à 40-70Hz. Ce régime montre une alternance de ces oscillations de faible amplitude à haute fréquence avec les potentiels d'action, de plus grande amplitude mais à fréquence moins

élevée. Nous avons assimilé ce comportement de décharge à des « oscillations de mode mixte » (MMOs pour *Mixed Mode Oscillations*), terme physique désignant un régime d'alternance d'événements de fréquence et d'amplitude différentes. Lorsque le courant injecté sur rampe dépasse un certain seuil, la zone « sous-primaire » laisse place à un régime de décharge « primaire » classique, caractérisé par l'absence d'oscillation et une plus grande régularité de fréquence. Suite à la description de ces MMOs, nous nous sommes demandé quels étaient les courants ioniques à leur origine et quels étaient les mécanismes définissant cette zone sous-primaire.

Des oscillations sous-seuil ont été observées dans différents types neuronaux (interneurones corticaux, Llinás et al. 1991; neurones pyramidaux, Gutfreund et al. 1995; etc.) et souvent associées à une résonance sous-seuil. Ce scénario ne semble cependant pas correspondre aux oscillations rencontrées dans les motoneurones de souris. Leur fréquence de résonance membranaire est en effet trop basse (7-30Hz) pour expliquer les oscillations et de plus la résonance disparaît lorsque la membrane atteint le seuil de décharge alors que les oscillations, absentes aux potentiel de repos, apparaissent quelques mV sous le seuil de décharge (Manuel et al. 2009). Notre hypothèse de travail a donc été que ces oscillations étaient liées aux courants générant les potentiels d'action et qu'elles résultaient d'une compétition entre le courant sodique et le courant potassique à rectification retardée. Nous avons combiné enregistrements intracellulaires *in vivo* et simulations numériques pour élucider les mécanismes à l'origine des MMOs dans les motoneurones de souris.

Méthodes

Expériences in vivo

Chirurgie

Pour les besoins de cette étude nos expériences ont été réalisées sur 20 souris femelles adultes de fond génétique CD1. Nous avons enregistré les motoneurones lombaires de ces souris grâce à la préparation *in vivo* développée précédemment par notre équipe (Manuel et al. 2009; Manuel & Heckman 2012). Dans cette préparation, la

souris est anesthésiée au pentobarbital sodique (70mg/kg), mise sous respiration artificielle (dioxygène pur) et paralysée par une injection de Pancuronium Bromide (0,1mg). La fréquence cardiaque est surveillée, la pression partielle en CO₂ (pCO₂) de l'air expiré maintenue à 4% et la température centrale à 37°C tout au long de l'expérience. Un cathéter veineux est introduit dans la jugulaire afin d'administrer l'anesthésique de manière régulière. Le nerf sciatique est disséqué et monté sur une électrode monopolaire de stimulation, la colonne vertébrale immobilisée entre les vertèbres Th12 et L2 et enfin, une laminectomie des lames vertébrales Th13 et L1 est réalisée pour exposer les segments spinaux L3 et L4. Cette préparation permet le maintien de l'animal dans de bonnes conditions physiologiques pendant plusieurs heures, et permet des enregistrements intracellulaires stables des motoneurones spinaux.

Enregistrements

Les enregistrements ont été réalisés au moyen de micro-pipettes de verre (diamètre à la pointe 1-1,5µm) remplies de KCl (3M) et de résistance comprise entre 3 et 10MΩ. Après empalement, les motoneurones sont identifiés en tant que tels par l'observation d'un potentiel d'action antidromique lors de la stimulation de son axone dans le nerf sciatique. Les motoneurones retenus pour l'analyse avaient tous un potentiel membranaire plus hyperpolarisé que -60mV et un potentiel d'action dépassant 0mV. Nous avons utilisé la technique du *Dynamic clamp* dans certaines expériences, cette technique permet d'injecter au neurone un courant mimant l'effet d'une conductance membranaire artificielle (Robinson & Kawai 1993, Sharp et al. 1993). Nous l'avons utilisé ici pour mimer un courant entrant persistant sodique (I_{Nap}) ou un courant d'AHP (I_{AHP}).

Modélisation

Nous avons par la suite utilisé un modèle mono-compartimental de motoneurone pour confirmer nos données expérimentales. Dans sa forme simple, notre modèle comportait uniquement les conductances rapides générant les potentiels d'action (i.e. la conductance sodique transitoire et le courant potassique de rectification retardée) et la conductance d'AHP, plus lente. Nous avons fait varier l'excitabilité membranaire de ce modèle en modulant ces conductances et en ajoutant une composante persistante au

courant sodique. Le comportement hystérétique des motoneurones a également été reproduit dans ce modèle par l'ajout d'une inactivation lente aux cinétiques des courants sodiques, transitoire et persistant, ou par l'ajout d'un courant potassique lent type I_M . L'activité synaptique perçue par les motoneurones a quant à elle été reproduite par l'ajout d'un bruit blanc gaussien. Finalement, nous avons simplifié ce modèle pour la dernière partie de cette étude en rassemblant en une unique variable les variables d'inactivation sodique et d'activation du courant potassique à rectification retardée. Ce modèle a ainsi été réduit à trois paramètres uniquement (potentiel membranaire, variable d'activation/inactivation potassique-sodique et temps) pour permettre l'analyse mathématique de la trajectoire du voltage responsable des MMOs.

Résultats

MMOs et hystérésis de la décharge dans les motoneurones de souris

Nous avons étudié les MMOs et le patron de décharge de 29 motoneurones spinaux en réponse à l'injection de rampes triangulaires lentes (1nA/s) de courant. Dans le cas le plus typique (21/29 motoneurones; [Article 1, Figure 1A](#)), le potentiel membranaire des motoneurones à leur recrutement affiche clairement des oscillations sous-seuil qui définissent la zone de décharge « sous-primaire ». Dans cette zone, chaque potentiel d'action est suivi par une AHP puis par une série d'oscillations sous-seuil ([Article 1, Figure 1B1, B3](#)). Le nombre d'oscillations et la durée de l'intervalle entre les potentiels d'action qui en découle sont très variables. Lorsque les rampes atteignent un courant d'intensité plus importante, ces oscillations disparaissent et laissent place au régime « primaire » de décharge ([Article 1, Figure 1B2](#)), de fréquence plus stable (Les courants injectés n'étaient pas suffisants pour atteindre la zone « secondaire » de décharge (Meehan et al. 2010). La réponse de ces motoneurones aux rampes est asymétrique. Sur la branche descendante des rampes, les MMOs sont présentes sur une gamme de courant plus importante et le courant de dé-recrutement des motoneurones est plus dépolarisé que celui auquel ils ont été recrutés. En conséquence la trajectoire de la courbe courant-fréquence de ces motoneurones suit une hystérésis dans le sens horaire ([Article 1, Figure 1B4](#)). De plus l'amplitude des potentiels d'action décroît sur la branche ascendante de ces rampes et demeure réduite pendant la branche descendante.

Dans une petite fraction des motoneurones (8/29; [Article 1, Figure 2A](#)) la décharge se comporte différemment. Leurs oscillations sont moins nombreuses et ne sont présentes que dans les premiers intervalles entre les potentiels d'action sur la branche ascendante des rampes ([Article 1, Figure 2B1, B2](#)) et les derniers intervalles précédents le dé-recrutement. Leur relation courant-fréquence suit cette fois-ci une trajectoire hystérétique dans le sens anti-horaire (i.e. leur courant de dé-recrutement est plus hyperpolarisé que leur courant de recrutement; [Article 1, Figure 2B3](#)) et l'amplitude de leurs potentiels d'action varie très peu.

Bien que la résistance d'entrée des motoneurones « horaire » était significativement plus petite ($3,7 \pm 2,0 \text{ M}\Omega$) que celle des motoneurones « anti-horaires » ($5,2 \pm 1,2 \text{ M}\Omega$; $p=0,02$), leur courant de recrutement n'était pas différent ($5,1 \pm 3,7 \text{ nA}$ pour les motoneurones horaires et $3,8 \pm 1,7 \text{ nA}$ pour les motoneurones « anti-horaires »). Ni le potentiel de repos ni le seuil des potentiels d'action n'étant différents entre ces deux groupes de motoneurones, la similarité de leur courant de recrutement est probablement dûe au fait que les oscillations induisent une grande variabilité dans le timing du premier potentiel d'action.

Les oscillations sous-seuil sont dues aux courants générant les potentiels d'action

Notre modèle basique (cf. Méthodes) était capable de reproduire ces oscillations sous-seuil. Elles y sont absentes au potentiel de repos mais y apparaissent, lors d'une rampe de courant, avant le premier potentiel d'action et pour un potentiel plus bas que le seuil d'activation des potentiels d'action ([Article 1, Figure 3A2](#)). Leur origine ne dépend donc pas de la conductance d'AHP, qui est activée pendant le potentiel d'action, mais des courants sodique transitoire et potassique à rectification retardée. Après le premier potentiel d'action, les oscillations réapparaissent après la relaxation de l'AHP et prennent de l'amplitude jusqu'au prochain potentiel d'action. Leur nombre diminue ensuite au fur et à mesure de l'augmentation de la fréquence de décharge jusqu'à disparaître totalement, marquant le début de la zone « primaire » de décharge ([Article 1, Figure 3A3](#)). La décharge de ce modèle en réponse à une rampe de courant est symétrique et ne présente pas d'hystérésis ([Article 1, Figure 3A1](#)): sur la branche descendante de la rampe, les

oscillations réapparaissent pour un courant égal à celui pour lequel elle avait disparu (i.e transition « zone sous-primaire » - zone « primaire ») et le courant de dé-recrutement équivaut à celui de recrutement.

Lorsqu'un bruit blanc gaussien est introduit dans ce modèle, les fluctuations du voltage sont responsables d'un abaissement du courant de recrutement étendant de fait la zone « sous-primaire » (Article 1, Figure 3B). La fréquence de décharge devient également très irrégulière dans ce régime « sous-primaire » et le fréquencesgramme affiche des bandes empilées (observées expérimentalement également). Les fluctuations du potentiel membranaire déclenchent les potentiels d'action après un nombre variable d'oscillations et chaque bande de fréquence correspond en fait à un nombre donné d'oscillations entre les potentiels d'action.

Les MMOs requièrent un état de faible excitabilité membranaire

Nous avons montré dans notre modèle que la largeur de la zone « sous-primaire » dépendait de l'équilibre entre les conductances sodiques et potassiques. L'ajout d'une composante persistante au courant sodique réduisait l'apparition des oscillations sous-seuil (Article 1, Figure 3C). Cette conductance sodique persistante diminuait le courant de recrutement en augmentant l'excitabilité du modèle et réduisait également la largeur de la zone « sous-primaire » (même effet, jusqu'à disparition des oscillations, en augmentant le courant sodique transitoire). De façon similaire, la diminution du courant de rectification retardée (Article 1, Figure 3D) réduisait la largeur de la zone « sous-primaire » et le courant de recrutement, indiquant une augmentation de l'excitabilité membranaire.

Nous avons ensuite testé expérimentalement les prédictions du modèle dans deux motoneurones. En utilisant la technique du *Dynamic clamp*, nous avons injecté à ces motoneurones un courant voltage-dépendant mimant la composante persistante de la conductance sodique (Article 1, Figure 4). De la même façon que dans le modèle, cette conductance artificielle a eu pour effet de réduire la zone « sous-primaire » des motoneurones et de faire disparaître les oscillations régularisant ainsi la décharge.

Ces résultats montrent que les MMOs sont déclenchées par les courants sodiques et potassiques à l'origine des potentiels d'action, validant ainsi notre hypothèse de travail. Ces MMOs requièrent cependant un état de faible excitabilité de la membrane. L'augmentation de cette excitabilité membranaire permettait de réduire l'apparition des oscillations et la zone « sous-primaire » dont elles sont responsables. La réponse de notre modèle basique était toutefois symétrique, indiquant qu'à l'inverse des MMOs, le comportement hystérétique de la décharge ne peut pas être reproduit par les courants générant les potentiels d'action uniquement.

L'inactivation lente du courant sodique est responsable du comportement hystérétique des motoneurones de souris

Pour expliquer l'hystérésis des motoneurones, nous avons incorporé des propriétés d'inactivation lente au courant sodique persistant de notre modèle ([Article 1, Figure 5](#)). Dans les conditions où la constante de temps de cette inactivation était fixée à 3s, la décharge du modèle montrait une large hystérésis horaire (le courant de dé-recrutement était plus grand que le courant de recrutement) en réponse à une rampe lente de courant (0.5nA/s; [Article 1, Figure 5A2](#)). Les zones « sous-primaire » et « primaire » étaient présentes sur les deux branches de la rampe mais plus étroites sur la branche descendante. L'amplitude des potentiels d'action se réduisait tout au long de la branche ascendante puis restait constante pendant la zone « primaire » de la branche descendante. Cette réduction d'amplitude est expliquée par la trajectoire de la variable d'inactivation lente sodique calculée par le modèle: la valeur de cette variable diminue du début de la décharge à la fin de la rampe ascendante puis reste relativement stable au cours de la rampe descendante ([Article 1, Figure 5A1](#)). L'inactivation sodique est donc plus forte à la fin de la décharge (40%) qu'au début (10%). Cette asymétrie de l'inactivation lente sodique au cours de la rampe explique aisément l'hystérésis de la courbe courant-fréquence. Une hystérésis horaire était observée lorsque la constante de temps de l'inactivation sodique était fixée à des valeurs supérieures à 1,5s, elle était maximale pour une constante de temps de 4s et diminuait progressivement jusqu'à quasiment disparaître pour une constante de temps de 60s ([Article 1, Figure 5C](#)).

Cette hystérésis est sensible à la vitesse de la rampe. L'augmentation de cette vitesse à 5nA/s rendait la courbe courant-fréquence plus symétrique, réduisait la diminution d'amplitude des potentiels d'action et étendait la zone « primaire » au détriment de la zone « sous-primaire ». Ces résultats s'expliquent par une inactivation moins importante du courant sodique pendant cette rampe rapide qu'au cours d'une rampe de 0,5nA/s et confirment la relation entre MMOs et excitabilité membranaire.

L'incorporation au modèle d'un courant potassique de type M, qui s'active sous le seuil de décharge avec une constante de temps de 3s déclenchant également l'apparition d'une hystérésis horaire sans toutefois reproduire la diminution de l'amplitude des potentiels d'action. Ceci suggère fortement que l'hystérésis horaire rencontrée dans les motoneurones de souris pendant les rampes lentes est largement causée par une inactivation lente sodique, bien que des courants potassiques puissent également jouer un rôle important.

L'AHP peut paradoxalement augmenter l'excitabilité membranaire et réduire les MMOs

L'AHP interagit avec l'inactivation lente sodique pour définir l'excitabilité membranaire et le patron de décharge. L'augmentation de la conductance d'AHP d'un facteur 10 dans notre modèle modifiait drastiquement le patron de décharge en faisant disparaître la zone « sous-primaire » et l'hystérésis ([Article 1, Figure 5B](#)). Cette augmentation de l'AHP dé-inactive en réalité le courant sodique faisant disparaître l'hystérésis. La dé-inactivation sodique rend également la membrane plus excitable ce qui a pour effet de faire disparaître les oscillations sous-seuil.

Les prédictions de notre modèle ont ensuite été validées en *Dynamic clamp* dans deux motoneurones spinaux ([Article 1, Figure 6](#)). Comme dans le modèle, l'injection d'un courant d'AHP artificiel, se sommant à l'AHP intrinsèque des motoneurones, avait pour effet de supprimer les MMOs et de symétriser la décharge sur rampes lentes de courant. Aussi, les potentiels d'action ne subissaient plus de diminution d'amplitude sur la branche ascendante, traduisant ainsi une dé-inactivation sodique.

Ces résultats suggèrent que le courant sodique des motoneurones de souris est doté de propriétés d'inactivation lente, réduisant l'excitabilité membranaire et favorisant l'apparition de MMOs. Finalement, cette inactivation lente serait également responsable de l'hystérésis horaire. Bien que le courant d'AHP soit hyperpolarisant et réduise la fréquence de décharge, il favorise l'apparition de la zone « primaire » en augmentant, paradoxalement, l'excitabilité membranaire par la dé-inactivation du courant sodique.

Origine de l'hystérésis anti-horaire

L'obtention d'une hystérésis anti-horaire dans notre modèle nécessite une constante de temps d'inactivation sodique comprise entre 50ms et 1,5s et une conductance d'AHP supérieure à 0.7 μ S. Pour une constante de temps d'inactivation sodique de 0,6s mais une conductance d'AHP maintenue à un bas niveau (0,1 μ S), seuls quelques potentiels d'action sont émis sur la branche ascendante de la rampe, suivis par un grand nombre d'oscillations sous-seuil ([Article 1, Figure 7A](#)). Ce comportement est possible parce que la constante d'inactivation est assez petite pour permettre une forte inactivation sodique, créant un état de faible excitabilité. Mais lorsque la conductance d'AHP était augmentée (1 μ S), elle permet la dé-activation du courant sodique et une décharge soutenue affichant une hystérésis anti-horaire ([Article 1, Figure 7B](#)). L'hystérésis dans ce sens est rendue possible par une plus forte dé-inactivation sodique, provoquée par l'AHP, sur la branche descendante que sur la branche ascendante.

Les MMOs résultent d'une bifurcation de la trajectoire homocline du potentiel

Nous avons proposé un scénario mathématique expliquant l'apparition des MMOs. Dans notre modèle réduit à trois dimensions (potentiel membranaire, variable d'activation/inactivation potassique-sodique et temps; cf. méthodes), les MMOs surviennent parce que deux conditions sont réunies: premièrement, le modèle de la trajectoire du potentiel dispose d'un point fixe, stable au potentiel de repos, mais montre une instabilité spiralaire autour de ce point fixe durant la zone « sous-primaire » et deuxièmement ce point fixe est revisité à chaque potentiel d'action ([Article 1, Figure 8](#)). La trajectoire du modèle retourne au point fixe après un potentiel d'action, mais puisque ce

point est instable, elle s'en éloigne en formant une spirale jusqu'à émission d'un nouveau potentiel d'action. Les oscillations sont générées par cette instabilité du point fixe et les MMOs (i.e. potentiels d'actions entrecoupés d'oscillations) sont liées à la trajectoire qui quitte ce point fixe mais y retourne lors de l'AHP. Une telle trajectoire (dotée d'un point fixe revisité périodiquement) est appelée trajectoire homocline en termes mathématiques. Le point fixe devient instable par une bifurcation du modèle lorsqu'apparaît cette trajectoire homocline. Ce scénario est connu sous le nom de bifurcation homocline de Shilnikov.

La fréquence de décharge augmente avec le courant injecté et la zone « sous-primaire » laisse place à la zone « primaire ». Cette transition survient parce que le point fixe devient de plus en plus instable (la trajectoire du modèle le quitte de plus en plus rapidement en spiralant de moins en moins autour) et parce que l'AHP commence à saturer. En effet, lorsque les intervalles entre les potentiels d'action deviennent trop courts, l'AHP n'a plus le temps de relaxer et le point fixe n'est plus atteint ([Article 1, Figure 8C](#)). Les oscillations disparaissent alors, et la zone « primaire » est atteinte. En revanche, lorsque le modèle est rendu plus excitable (augmentation du ratio sodium/potassium), il n'existe pas de gamme de courant injecté pour laquelle la trajectoire du modèle spirale autour d'un point fixe instable. En conséquence, les MMOs n'y sont pas générées.

Conclusions

Ces résultats, théoriques et expérimentaux, nous ont permis de montrer que les oscillations de mode mixte observées dans les motoneurones spinaux de souris étaient causées par les courants sodiques et potassiques à l'origine des potentiels d'action et qu'elles apparaissaient lorsque la membrane était dans un état de relative faible excitabilité. Nous avons également montré que l'inactivation lente sodique, participant à la faible excitabilité membranaire, était responsable du comportement hystérétique dans le sens horaire de la décharge de ces motoneurones et facilitait l'apparition des MMOs. Nous avons expliqué le comportement hystérétique parfois rencontré dans les motoneurones par une dé-inactivation du courant sodique par le courant d'AHP. L'AHP permet donc de manière paradoxale d'augmenter l'excitabilité membranaire. Nous avons finalement pu expliquer ces MMOs par un scénario mathématique de bifurcation homocline de Shilnikov. Les motoneurones présentant une hystérésis anti-horaire étaient également ceux possédant les plus grandes résistances d'entrée, ce qui suggère une possible relation entre le type physiologique des motoneurones et leur patron de décharge.

Article 1

Mixed Mode Oscillations in Mouse Spinal Motoneurons Arise from a Low Excitability State

Mixed Mode Oscillations in Mouse Spinal Motoneurons Arise from a Low Excitability State

Caroline Iglesias,¹ Claude Meunier,¹ Marin Manuel,² Yulia Timofeeva,³ Nicolas Delestrée,¹ and Daniel Zytnicki¹

¹Laboratoire de Neurophysique et Physiologie, Université Paris Descartes, Institut des Neurosciences et de la Cognition, Centre National de la Recherche Scientifique UMR 8119, Paris 75006, France, ²Department of Physiology, Feinberg School of Medicine, Northwestern University, Chicago, Illinois 60611, and ³Department of Computer Science and Centre for Complexity Science, University of Warwick, Coventry CV4 7AL, United Kingdom

We explain the mechanism that elicits the mixed mode oscillations (MMOs) and the subprimary firing range that we recently discovered in mouse spinal motoneurons. In this firing regime, high-frequency subthreshold oscillations appear a few millivolts below the spike voltage threshold and precede the firing of a full blown spike. By combining intracellular recordings *in vivo* (including dynamic clamp experiments) in mouse spinal motoneurons and modeling, we show that the subthreshold oscillations are due to the spike currents and that MMOs appear each time the membrane is in a low excitability state. Slow kinetic processes largely contribute to this low excitability. The clockwise hysteresis in the I – F relationship, frequently observed in mouse motoneurons, is mainly due to a substantial slow inactivation of the sodium current. As a consequence, less sodium current is available for spiking. This explains why a large subprimary range with numerous oscillations is present in motoneurons displaying a clockwise hysteresis. In motoneurons whose I – F curve exhibits a counterclockwise hysteresis, it is likely that the slow inactivation operates on a shorter time scale and is substantially reduced by the de-inactivating effect of the afterhyperpolarization (AHP) current, thus resulting in a more excitable state. This accounts for the short subprimary firing range with only a few MMOs seen in these motoneurons. Our study reveals a new role for the AHP current that sets the membrane excitability level by counteracting the slow inactivation of the sodium current and allows or precludes the appearance of MMOs.

Introduction

In a recent work, we showed that spinal motoneurons of anesthetized mice display a subprimary firing range in response to a slow ramp of current (Manuel et al., 2009). This range is characterized by subthreshold oscillations at high frequency (100–150 Hz) that precede the firing of a full blown spike. In this regime, the discharge is very irregular, starts at frequencies as low as 2–3 Hz and increases with the current up to 40–70 Hz. We dubbed this firing behavior mixed mode oscillations (MMOs) as in physics, where MMOs refer to a dynamical regime where high-frequency oscillations of small amplitude alternate with low-frequency oscillations of large amplitude (i.e., the spikes). The subprimary range is followed by the classical primary range where there are no oscillations between spikes and the discharge is more regular. The subprimary firing range was never observed in cat motoneurons but has been recently described in rat spinal motoneurons (Turkin et al., 2010). It is likely that a substantial portion of the motor

unit force is graded in this firing range. However, we do not know which ionic currents are responsible for the oscillations and shape the discharge in the subprimary range.

MMOs have previously been reported in interneurons (Llinás et al., 1991) and pyramidal cells of the frontal cortex (Gutfreund et al., 1995), stellate cells of the entorhinal cortex (Alonso and Klink, 1993; Klink and Alonso, 1993), magnocellular neurons of the supraoptic nucleus (Boehmer et al., 2000), trigeminal mesencephalic neurons (Wu et al., 2001), striatal fast spiking interneurons (Bracci et al., 2003), and vibrissa motoneurons (Nguyen et al., 2004; Harish and Golomb, 2010). In some cases, they were shown to be associated with a subthreshold resonance due to a slowly activating potassium current and enhanced by the persistent sodium current (Gutfreund et al., 1995; Wu et al., 2001, 2005). However, the frequency of the resonance in mouse motoneurons is too low (7–30 Hz) to account for the high frequency of oscillations (Manuel et al., 2009). Moreover, the resonance disappears when the membrane is depolarized toward the spike voltage threshold. In sharp contrast, the fast oscillations are absent at the resting potential and appear a few millivolts below the spike threshold (Manuel et al., 2009). Thus, MMOs in mouse motoneurons are not related to the subthreshold resonance. Our working hypothesis is that they are linked to the spiking mechanism itself and arise from the interplay between the sodium current and the delayed rectifier current.

We combined experimental (including *in vivo* dynamic clamp experiments) and theoretical studies (simulations and dynamical systems analysis) to elucidate the mechanisms underlying MMOs

Received Dec. 7, 2010; revised Jan. 28, 2011; accepted Feb. 21, 2011.

This work was supported by the Association Française contre les Myopathies (AFM, MNM2 2009 Grant 14229) and by the Programme interdisciplinaire Neuroinformatique [Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS)]. C.I. is supported by a postdoctoral fellowship from the CNRS. M.M. is supported by the Fondation pour la Recherche Médicale and the Milton Safenowitz Post-Doctoral Fellowship for ALS Research (ALS Association). Y.T. is supported by a Research Councils of the United Kingdom fellowship and N.D. by a fellowship from the Paris Descartes University. We are indebted to A. Goulian for taking care of animals, and to H. Suaudeau for script programming.

Correspondence should be addressed to Daniel Zytnicki, Laboratoire de Neurophysique et Physiologie, Institut des Neurosciences et de la Cognition, Université Paris Descartes, 45 rue des Saints-Pères, 75270 Paris Cedex 06, France. E-mail: Daniel.Zytnicki@parisdescartes.fr.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.6363-10.2011

Copyright © 2011 the authors 0270-6474/11/315829-12\$15.00/0

in mouse motoneurons. We show that high-frequency oscillations are indeed due to the fast currents involved in spike generation and that MMOs require a low membrane excitability, most likely due to a slow inactivation of the sodium current. We reveal a major role for the afterhyperpolarization (AHP) current, which paradoxically enhances membrane excitability by de-inactivating the sodium current and suppresses MMOs.

Materials and Methods

Experiments

Animal preparation. Experiments were performed *in vivo* on 20 female adult CD1 mice weighing 22–42 g (from Charles River Laboratories or bred at Northwestern University). The same experimental protocol was used in Paris and in Chicago. Experiments yielded similar results, and the data were pooled together. In accordance with French legislation, the investigators had valid licenses to perform experiments on live vertebrates delivered by the Direction des Services Vétérinaires (Préfecture de Police, Paris, France). Experiments conducted at Northwestern University were performed under full approval from the Northwestern University Animal Care and Use Committee. At the onset of experiments, atropine (0.20 mg/kg, Aguettant) and methylprednisolone (0.05 mg, Solu-Medrol, Pharmacia) were given subcutaneously to prevent salivation and edema, respectively. Fifteen minutes later, the anesthesia was induced with an intraperitoneal injection of sodium pentobarbitone (70 mg/kg; Pentobarbital, Sanofi). A tracheotomy was performed, and the mouse was artificially ventilated with pure oxygen (SAR-830/P ventilator, CWE). The end-tidal PCO₂ was maintained ~4% (MicroCapstar, CWE). The heart rate was monitored (CT-1000, CWE), and the central temperature was kept at 38°C using an infrared heating lamp. A catheter was introduced in the external jugular vein, allowing for supplementary anesthesia by intravenous injections (6 mg/kg) whenever necessary (usually every 10–20 min). The adequacy of anesthesia was assessed on the lack of noxious reflexes and on the stability of the heart rate (usually 400–500 bpm) and end-tidal PCO₂. A slow intravenous infusion (50 μl/h) of a 4% glucose solution containing NaHCO₃ (1%) and gelatin (14%; Plasmagel, Roger Bellon) helped to maintain the physiological parameters. The sciatic nerve was dissected and mounted on a monopolar electrode for stimulation. The vertebral column was immobilized with two pairs of horizontal bars (Cunningham Spinal Adaptor, Stoelting) applied on the Th12 and L2 vertebral bodies, and the L3–L4 spinal segments were exposed by a laminectomy at the Th13–L1 level. The tissues in hindlimb and the spinal cord were covered with pools of mineral oil. After the surgery, the animal was paralyzed with Pancuronium Bromide (Pavulon, Organon SA, initial bolus: 0.1 mg, followed by a continuous infusion 0.01 mg/h). This preparation allowed us to maintain the animal in good physiological conditions for 6–10 h after the end of the surgery and to make stable intracellular recordings of motoneurons and dynamic clamp experiments. At the end of the experiments, animals were killed with a lethal intravenous injection of pentobarbitone.

Recordings. Intracellular recordings of motoneurons were performed using micropipettes (tip diameter 1.0–1.5 μm) filled with KCl 3M (resistance 5–10 MΩ), an Axoclamp 2B amplifier (Molecular Devices) connected to a Power1401 interface, and the Spike2 software (CED). After impalement, identification of motoneurons rested on the observation of antidromic action potentials in response to the electrical stimulation of their axon in the sciatic nerve. All motoneurons retained for analysis had a resting membrane potential more hyperpolarized than –60 mV and an overshooting action potential. All recordings and dynamic clamp experiments were performed using the discontinuous current-clamp mode (7–9 kHz) of the amplifier because it allows for reliable measurements of the membrane potential, even when large currents are injected (Brizzi et al., 2004). The input resistance was determined from the responses to a series of small-amplitude square current pulses (–1.5 to +1.5 nA) as in the study by Manuel et al. (2009).

Discharge properties. The discharge properties were routinely investigated using triangular ramps of current with a velocity of 0.5–2 nA/s. Occasionally, slower ramps (down to 0.1 nA/s) or faster ramps (up to 10 nA/s) were applied to investigate the impact of the ramp velocity on the

discharge pattern. The maximum intensity ranged from 2 to 15 nA, depending on the recruitment threshold of the motoneuron. *I–F* curves were obtained by plotting the instantaneous firing frequency versus the intensity of the injected current at spike time. The threshold of the first spike in the ascending ramp was determined as the point where the rate of rise of the voltage exceeded 10 mV/ms (Sekerli et al., 2004).

Dynamic clamp. The dynamic clamp current was injected into the motoneuron soma through the recording micropipette. It was computed by a PC running RT-Linux (a Linux kernel modified to achieve real-time processing) and the dynamic clamp software MRCI (Raikov et al., 2004). The system allows the computation at a speed of 10 kHz of the equations modeling the persistent sodium current (I_{Nap}) or the AHP current. The equations used for I_{Nap} were as in the study by Manuel et al. (2007):

$$I_{\text{Nap}} = G_{\text{Nap}} m_p (V_{\text{Nap}} - V), \quad (1)$$

$$\tau_{\text{mp}} \frac{dm_p}{dt} = m_p(V) - m_p, \quad (2)$$

and

$$m_p(V) = \frac{1}{1 + \exp(-(V + V_{\text{mp}}^{\text{mid}})/k_{\text{mp}})}, \quad (3)$$

where G_{Nap} is the maximal conductance of the current, m_p is its activation variable, V_{Nap} its reversal potential, V is the membrane potential, τ_{mp} is the activation time constant, $m_p(V)$ is the steady-state activation curve, $V_{\text{mp}}^{\text{mid}}$ is the half-activation voltage, and k_{mp} determines the slope of the activation curve. We set V_{Nap} to 50 mV, τ_{mp} to 1 ms, k_{mp} to 2 mV. $V_{\text{mp}}^{\text{mid}}$ was set at the mid-AHP following the first spike, i.e., below the spiking voltage threshold. G_{Nap} ranged from 0.02 to 0.06 μS.

For simplicity, the AHP current was modeled as an effective voltage-dependent current (Manuel et al., 2006), as follows:

$$I_{\text{AHP}} = G_{\text{AHP}} z(t) (V_{\text{AHP}} - V), \quad (4)$$

where G_{AHP} was the maximal conductance, $z(t)$ the voltage-dependent activation variable and V_{AHP} the reversal potential. We incorporated AHP summation in our model using the same formalism as in Meunier and Borejsza (2005). We instantaneously increased z from z_{before} to the following:

$$z_{\text{after}} = \alpha \cdot z_{\text{before}} + (1 - \alpha), \quad (5)$$

where $0 \leq \alpha \leq 1$, when the membrane voltage crossed the value 0 mV during the spike upstroke. We then let the activation variable relax exponentially with the time constant τ_z (i.e., $z(t) = z_{\text{after}} \cdot e^{-t/\tau_z}$) until the next spike occurred. In our experiments, α was fixed at 0.5, so that the first spike already recruited half of the maximal artificial conductance. The reversal potential (V_{AHP}) was always set to –100 mV. This value was chosen for technical reasons to ensure that the dynamic clamp generated current was always negative. G_{AHP} ranged from 0.1 to 0.5 μS (0 in the control condition), and τ_z was set to 10 ms, the mean value of the relaxation time constant measured in mouse motoneurons (Manuel et al., 2009).

Modeling

To make sense of the experimental data, we analyzed a single compartment conductance-based model of mouse motoneuron, using both numerical simulations and mathematical analysis based on classical techniques of dynamical systems theory.

Numerical simulations. In its simplest form (basic model), our model incorporates only the two fast conductances that generate spikes (the transient sodium conductance and the delayed rectifier potassium conductance), and the slower AHP conductance. The equations of the model are as follows:

$$C_m \frac{dV}{dt} = G_l(V_l - V) + G_{\text{Na}} m_{\infty}(V)^3 h(V_{\text{Na}} - V) + G_K n(V_K - V) + G_{\text{AHP}} z(V_K - V) + I(t), \quad (6)$$

$$\tau_h \frac{dh}{dt} = h_\infty(V) - h, \quad (7)$$

$$\tau_n \frac{dn}{dt} = n_\infty(V) - n, \quad (8)$$

$$\tau_z(V) \frac{dz}{dt} = z_\infty(V) - z. \quad (9)$$

The leak conductance G_l was set to $0.3 \mu\text{S}$ and the membrane capacitance to 0.8 nF , in accordance with the average values of the passive time constant τ_m and the input conductance measured in mouse motoneurons (Manuel et al., 2009). The reversal potential of the leak current was $V_l = -66 \text{ mV}$. The steady-state activation and inactivation functions of the sodium conductance were as follows:

$$m_\infty(V) = \frac{1}{1 + \exp(-(V + 46)/10)}, \quad (10)$$

$$h_\infty(V) = \frac{1}{1 + \exp((V + 70)/10)}, \quad (11)$$

and the activation function of the delayed rectifier conductance was as follows:

$$n_\infty(V) = \frac{1}{1 + \exp(-(V + 40)/10)}. \quad (12)$$

The sodium conductance was assumed to activate instantaneously and to inactivate fast with the time constant $\tau_h = 1 \text{ ms}$. The delayed rectifier conductance activated with the same time constant $\tau_n = 1 \text{ ms}$. The AHP conductance was modeled by its effective voltage dependence as in dynamic clamp experiments. However, the activation variable z increased in the model with a time constant of 0.1 ms during spikes to avoid discontinuities in the dynamics. Values of the reversal potentials and maximal conductances of the spike-generating currents were $V_{\text{Na}} = 50 \text{ mV}$, $V_K = -90 \text{ mV}$. Values of G_{Na} , G_K , and G_{AHP} of 40 , 3.5 , and $0.3 \mu\text{S}$ were used, unless otherwise indicated.

We modified the balance between inward and outward currents, and thereby the membrane excitability, by increasing the transient sodium conductance, decreasing the delayed rectifier conductance, or adding a persistent component to the sodium current. This persistent sodium current had the same activation kinetics as the transient component, but its activation curve was shifted downward by 5 mV .

To account for hysteretic effects, we added to this basic model either a very slow inactivation process to the kinetics of sodium currents (both transient and persistent components) or added a very slow I_M -like potassium current. The slow inactivation of the sodium current was independent of the fast inactivation and was governed by the kinetic equation, as follows:

$$\tau_{\text{hs}} \frac{dhs}{dt} = hs_\infty(V) - hs, \quad (13)$$

where

$$hs_\infty(V) = \frac{1}{1 + \exp((V + 63)/3)}. \quad (14)$$

and the time constant τ_{hs} was of the order of the second. The activation of the slow potassium current followed a similar equation, as follows:

$$\tau_{\text{ns}} \frac{dns}{dt} = ns_\infty(V) - ns, \quad (15)$$

where

$$ns_\infty(V) = \frac{1}{1 + \exp(-(V + 60)/5)}. \quad (16)$$

Voltage fluctuations, as seen in experimental recordings, were incorporated by adding a Gaussian white noise component (SD $\sigma = 0.2$) mimicking synaptic background to the injected current. We checked that adding random fluctuations to the activation of the transient sodium conductance (channel noise) led to similar results.

In the noiseless case, the differential equations of the model were solved using the standard fourth order Runge–Kutta algorithm implemented in XPPAUT (Ermentrout, 2002). An Euler algorithm with a time step 10 times smaller was used when noise was added. XPPAUT was also used for the dynamical systems analysis (phase plane, bifurcation scheme) of the reduced model below.

Reduced model. To further reduce the number of variables and simplify the mathematical analysis, we lumped together the sodium conductance inactivation variable h and the delayed rectifier activation variable n in a single recovery variable W with the dimension of a voltage. This led us to a model that had only three dimensions when slow kinetic processes were not taken into account. The reduction was performed as in the study by Abbot and Kepler (1990). We replaced the gating variables h and n by the potentials W_h and W_n via the change of variables $h = h_\infty(W_h)$, $n = n_\infty(W_n)$. We then substituted W_h and W_n with a single variable W , chosen so as to best approximate the impact of W_h and W_n on voltage evolution. We thus reduced the model to a three-dimensional system for the variables V , W , and z , as follows:

$$C_m \frac{dV}{dt} = G_l(V_l - V) + G_{\text{Na}} m_\infty(V)^3 h_\infty(W)(V_{\text{Na}} - V) + G_K n_\infty(W)(V_K - V) + G_{\text{AHP}} z(V_K - V) + I(t), \quad (17)$$

$$\frac{dW}{dt} = \frac{\gamma_h(V, W)}{\gamma_h(V, W) + \gamma_n(V, W)} \frac{h_\infty(V) - h_\infty(W)}{\tau_h dh_\infty(W)/dW} + \frac{\gamma_n(V, W)}{\gamma_h(V, W) + \gamma_n(V, W)} \frac{n_\infty(V) - n_\infty(W)}{\tau_n dn_\infty(W)/dW}, \quad (18)$$

$$\tau_z(V) \frac{dz}{dt} = z_\infty(V) - z. \quad (19)$$

In Equation 18,

$$\gamma_h(V, W) = \frac{\partial I_{\text{Na}}}{\partial h_\infty} \frac{dh_\infty}{dW} \quad (20)$$

and

$$\gamma_n(V, W) = \frac{\partial I_K}{\partial n_\infty} \frac{dn_\infty}{dW} \quad (21)$$

are the derivatives of the currents $I_{\text{Na}}(V, W) = G_{\text{Na}} m_\infty(V)^3 h_\infty(W)(V_{\text{Na}} - V)$ and $I_K(V, W) = G_K n_\infty(W)(V_K - V)$ with respect to W .

They quantify how the voltage dependence of sodium current inactivation and potassium current activation make these currents change with the potential. We also introduce for later use the following:

$$\gamma_m(V, W) = \frac{\partial I_{\text{Na}}}{\partial m_\infty} \frac{dm_\infty}{dV}, \quad (22)$$

which quantifies how the sodium current changes with the potential because of its voltage-dependent activation.

Mathematical analysis of the reduced model

The fixed points of the basic model (noiseless and without slow kinetic processes) are located in the $z = 0$ plane and given by the intersections of the two nullclines $dV/dt = 0$ and $dW/dt = 0$. The second nullcline is just the straight line $V = W$. Setting $dV/dt = 0$, $z = 0$, and $W = V$ in Equation 17, one sees that the fixed point voltage is given by the steady-state current voltage equation, as follows:

$$G_l(V - V_l) + G_{\text{Na}} m_\infty(V)^3 h_\infty(V)(V - V_{\text{Na}}) + G_K n_\infty(V)(V - V_K) = I. \quad (23)$$

This equation has either one solution (low excitability) or three (high excitability).

The characteristics of the subthreshold oscillations are derived from the linear stability analysis of the unique fixed point in the low excitability state, which becomes unstable at firing onset. Linearizing Equations 17–19 around this fixed point and computing the eigenvalues, we obtain a real negative eigenvalue in the z direction and two complex conjugate eigenvalues with positive real part in the V, W plane. The growth rate μ and frequency ν of fast oscillations are respectively given by the real and imaginary parts of these complex eigenvalues:

$$\mu = \frac{\gamma_m - G_{\text{rest}}}{2G_1\tau_m} - \frac{1}{2\tau_r} \text{ and}$$

$$\nu^2 = -\frac{\gamma_h + \gamma_n}{4\pi^2 G_1\tau_m\tau_r} - \frac{1}{16\pi^2\tau_m^2} \left(\frac{3\gamma_m - G_{\text{rest}}}{G_1} + \frac{\tau_m}{\tau_r} \right)^2. \quad (24)$$

In these equations

$$G_{\text{rest}} = G_1 + G_{\text{Na}}m_{\infty}(V)^3h_{\infty}(V) + G_{\text{K}}n_{\infty}(V) \quad (25)$$

is the resting membrane conductance, the recovery time τ_r is the common value of τ_h and τ_n , and γ_m , γ_h , and γ_n are calculated at the fixed point (i.e., for $V = W$).

Results

Mixed mode oscillations and hysteretic firing patterns in mouse motoneurons

We investigated the mixed mode oscillations and the discharge pattern of 29 spinal motoneurons in response to triangular ramps of current. The most typical case, observed in 21 motoneurons, is shown in Figure 1. In response to a 1 nA/s ramp of current, the first spike was emitted when the current intensity reached 8.3 nA (recruitment current). The discharge then clearly displayed MMOs, which defined the subprimary firing range. In this range, each spike was followed by an AHP and then by a series of fast subthreshold oscillations superimposed on a voltage plateau (Fig. 1B1, arrows). The number of oscillations and, accordingly, the duration of each interspike interval were quite variable. In this motoneuron, the subprimary firing range lasted until the current reached 9.8 nA, i.e., over a current range of 1.5 nA. For higher current intensities, the fast oscillations disappeared (see enlargement in Fig. 1B2), indicating that the primary firing range was reached. The response to the triangular current ramp was asymmetrical. MMOs were present on most of the descending ramp (Fig. 1B3), and the derecruitment current was higher (10.8 nA) than the recruitment current. As a consequence, the I – F relationship displayed a clockwise hysteresis (Fig. 1B4). Moreover, the amplitude of the action potentials was not the same during the ascending and descending ramps of current. It substantially decreased during the ascending ramp and remained low during the descending ramp.

The eight other motoneurons exhibited different discharge properties as exemplified in Figure 2. The illustrated motoneuron was also submitted to a 1 nA/s ramp of current. Fast oscillations

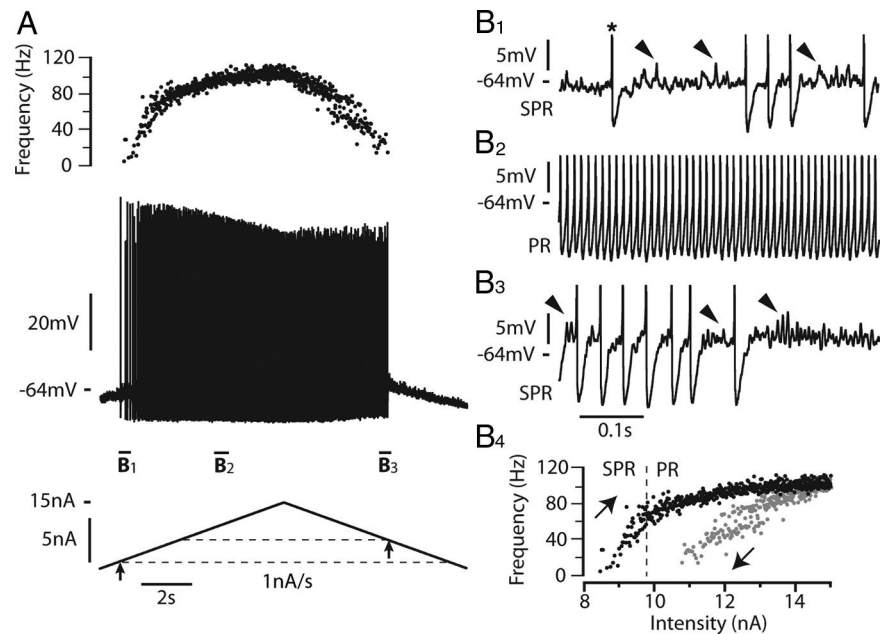


Figure 1. Most motoneurons respond to a slow triangular current ramps with a discharge displaying MMOs and a clockwise hysteresis. **A**, Response to a 1 nA/s triangular ramp of current (15 nA amplitude). Instantaneous firing frequency (top trace), voltage response (middle trace), and injected current (bottom trace) are shown. The resting potential was -74 mV and the voltage threshold for the first spike (-64 mV) was reached when the current intensity was 8.3 nA (recruitment current, arrow below the ascending current ramp and lower dashed line). Note the decrease in spike amplitude during the ascending ramp and its stabilization at a low level during the descending ramp. The derecruitment current on the descending ramp was 10.8 nA, i.e., larger than the recruitment current (arrow on descending ramp and upper dashed line). **B1**, Magnification of the voltage trace near recruitment. The asterisk indicates the first spike on the ascending ramp. Spikes have been truncated to better see the voltage oscillations (some of them indicated by arrowheads) that appear in the interspike intervals after the AHP has fully relaxed. Note the firing variability that characterizes the subprimary range (SPR). **B2**, Increasing the injected current resulted in a primary firing range (PR) without oscillation between spikes and with less variability. **B3**, Magnification of the voltage trace near the derecruitment current. Firing becomes irregular again, and subthreshold oscillations reappear between spikes. **B4**, I – F relationship. Black and gray dots indicate the instantaneous frequency of each spike during the ascending and descending ramps, respectively. Note the clockwise hysteresis of the I – F relationship. The transition from the SPR to the PR occurred at 9.8 nA on the ascending ramp (dashed line). The input resistance of this motoneuron was 2.1 M Ω .

(Fig. 2B1, arrow) developed a few millivolts below the voltage threshold for the first spike (-53 mV). MMOs were present only during the first few interspike intervals of the ascending ramp over a current range of 0.3 nA (Fig. 2B1) and during the last intervals preceding derecruitment (Fig. 2B2). In sharp contrast with the motoneuron shown in Figure 1, the I – F relationship displayed a counterclockwise hysteresis, the derecruitment current (2.4 nA) being smaller than the recruitment current (3.4 nA) (Fig. 2B3). Moreover, spike amplitude varied little. The resting membrane potentials of the two motoneurons illustrated in Figures 1 and 2 were close (-74 mV and -76 mV, respectively). This indicates that their different firing patterns were due to genuine differences in their intrinsic membrane properties. It is interesting to note that the input resistance of motoneurons displaying a clockwise hysteresis was significantly smaller (3.7 ± 2.0 M Ω , $N = 21$) than the input resistance of motoneurons displaying a counterclockwise hysteresis (5.2 ± 1.2 M Ω , $N = 7$, Student's t test $p = 0.02$). The recruitment current was not significantly different between the two groups: 5.1 ± 3.7 nA ($N = 21$) in the motoneurons displaying a clockwise hysteresis and 3.8 ± 1.7 nA ($N = 8$) in those displaying a counterclockwise hysteresis (Student's t test $p = 0.2$). This is because the presence of the subthreshold oscillations made the timing of the first spike quite variable. The spike voltage thresholds were similar in the motoneurons displaying the clockwise hysteresis (-51 ± 10 mV) and in those displaying the counterclockwise hysteresis (-52 ± 10 mV).

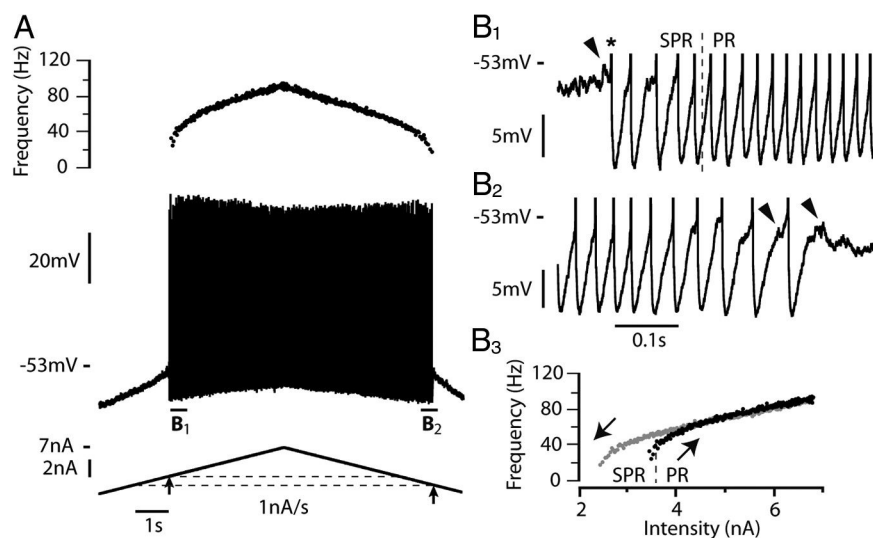


Figure 2. The discharge of a minority of motoneurons displays a counterclockwise hysteresis. **A**, Response of another motoneuron to a 1 nA/s triangular ramp of current (6.8 nA amplitude). Same arrangement as in Figure 1A. The resting potential was -76 mV and the voltage threshold for the first spike (-53 mV) was reached for a current intensity of 3.4 nA (recruitment current). Note that spike amplitude decreased much less during the ascending ramp than in Figure 1. The derecruitment current on the descending ramp was 2.4 nA, i.e., smaller than the recruitment current. **B1**, Magnification of the voltage trace near recruitment (truncated spikes). Voltage oscillations (arrowhead) appear before the first spike (asterisk) and remain present in the first few interspike intervals, giving rise to a small subprimary range (SPR). **B2**, Magnification of the voltage trace near the derecruitment current. **B3**, I - F relationship. Note the counterclockwise hysteresis. The transition from SPR to primary firing range (PR) occurred at 3.7 nA (dashed line). Note that a few subthreshold oscillations reappear. The input resistance of this motoneuron was 5.3 M Ω .

The fast subthreshold oscillations are due to the spike-generating currents

MMOs, associated with a subprimary firing range, do occur in our basic model that only incorporates the two (sodium and potassium) spike-generating conductances and the AHP conductance (see Materials and Methods). The voltage response of the model to a slow triangular current ramp (0.5 nA/s) is displayed in Figure 3A1. Near rest, the membrane voltage exhibits no oscillations. They appear before the first spike (recruitment current 4.4 nA), at a membrane potential of -62 mV, i.e., 3 mV lower than the spike voltage threshold (Fig. 3A2, filled arrowhead). As the AHP conductance is activated during the spike, this indicates that the subthreshold oscillations are not due to the AHP. In our model, they are caused by the spike-generating currents. After the first spike, the voltage reaches a stationary potential when the AHP has subsided (Fig. 3A2, open arrowhead). Fast oscillations emerge on top of it and grow in amplitude until a new spike is triggered. As the injected current increases, the number of oscillations between two successive spikes decreases, which accounts for the frequency steps observed in the subprimary firing range (see frequencygram in Fig. 3A1). The oscillations totally disappear when the injected current reaches 7.3 nA (Fig. 3A3). The high-frequency regime, starting at 74 Hz in the example illustrated, corresponds to the primary firing range. On the descending current ramp, MMOs reappear for 7.3 nA (Fig. 3A1, second vertical line), i.e., the same current as for the transition from the subprimary to the primary firing range on the ascending ramp. The derecruitment current (4.3 nA) is close to the recruitment current on the ascending ramp: the response is symmetrical and shows no significant hysteresis.

When white noise is added to the injected current (Fig. 3B) or sodium channel noise is incorporated in the model (data not shown), the recruitment current is lowered (Fig. 3, compare B2, 3.8 nA vs A2, 4.4 nA) because voltage fluctuations bring the mem-

brane to the voltage threshold for spiking. This extends the subprimary range. Moreover, the discharge becomes particularly irregular in the subprimary range, and stacked bands are present in the frequencygram (Fig. 3B1, top) as in experimental recordings (see Fig. 6A for an example). They are due to variations of the number of oscillations from one interspike interval to the other (Fig. 3B2). However, as in the noiseless case, the discharge is quite symmetrical with similar behavior on the ascending and descending ramps.

MMOs require a low membrane excitability

The width of the subprimary firing range depends on the balance between the sodium and potassium currents. For instance, adding a persistent component to the sodium current reduces MMOs. When the persistent conductance is equal to 0.5 μ S (1.25% of the transient conductance, set to 40 μ S), the recruitment current is reduced from 4.4 to 3.4 nA because of the increased excitability (Fig. 3C). In parallel, the width of the subprimary range is strongly reduced (0.4 nA compared with 2.9 nA without persistent sodium current). Increasing the maximal conductance of the transient sodium current to 45 μ S has a similar effect (data not shown). MMOs even disappear completely when the transient sodium conductance is increased beyond 60 μ S. A decrease of the delayed rectifier current also reduces MMOs. Figure 3D shows that decreasing its conductance from 3.5 to 3 μ S reduces the width of the subprimary range from 2.9 nA to 0.5 nA. At the same time, the recruitment current decreased from 4.4 to 3.0 nA, indicating an enhanced membrane excitability.

We tested experimentally in two motoneurons the prediction of the model that the persistent sodium current reduces the subprimary firing range. Using dynamic clamp, we added a fast activating inward current that mimicked the persistent component of the sodium current. In the case illustrated in Figure 4A, the motoneuron discharge remained in the subprimary firing regime during the whole current ramp in the absence of dynamic clamp: fast oscillations were present in almost all interspike intervals (Fig. 4A2,A3), and the discharge was very irregular (Fig. 4A1). When the artificial persistent inward current was added (Fig. 4B), the width of the subprimary range decreased (see the oscillations in Fig. 4B2), and a primary firing range appeared at the highest current intensities. In this range, the discharge was much more regular (see the frequencygram on the top of Fig. 4B1) and no oscillations could be seen in any interspike interval (Fig. 4B3). In the other motoneuron, the subprimary range also decreased at the benefit of the primary range when a persistent inward current was added by dynamic clamp. These experimental results are in keeping with our theoretical results.

Altogether, our results show that MMOs are elicited by the spike-generating sodium and potassium currents, thus validating our working hypothesis. However, MMOs require a low membrane excitability, where the sodium current is sufficient to sustain a repetitive discharge but does not prevail too much upon the potassium current. Increasing the excitability reduces the subprimary firing range or even makes it disappear. In our basic model,

the response to the triangular current ramps is symmetrical, and the recruitment and derecruitment currents nearly equal. This indicates that, in contrast with MMOs, the hysteretic behavior cannot be elicited by the fast spike-generating currents alone.

Slow inactivation of the sodium current accounts for the hysteretic properties of mouse motoneurons

To account for the hysteretic properties of mouse motoneurons, we endowed the transient sodium current used in the model with slow inactivation properties (see Materials and Methods). In the example shown in Figure 5A, the discharge pattern of the model displayed a large clockwise hysteresis in response to a slow current ramp (0.5 nA/s) when the time constant of slow inactivation of the sodium current was set to 3 s: the derecruitment current was 3.6 nA larger than the recruitment current. Both the ascending and descending ramps displayed subprimary and primary firing ranges. However, the primary range was narrower during the descending ramp. The spike amplitude was reduced by 12 mV over the ascending ramp but remained nearly constant during the primary range on the descending ramp. The slow inactivation variable (h_s , see Materials and Methods) progressively decreased from 0.90 at discharge onset down to 0.56 at the end of the ascending ramp, which accounts for this reduction of spike amplitude (Fig. 5A1). During the descending ramp, h_s had increased to only 0.6 when derecruitment occurred, i.e., inactivation was much stronger at discharge termination (40%) than at discharge onset (10%). This asymmetry of inactivation between the ascending and the descending ramps readily accounts for the clockwise hysteresis of the I - F curve (Fig. 5A2). A clockwise hysteresis was observed in the I - F curve when the slow inactivation time constant was larger than 1.5 s. Figure 5C shows how the size of this hysteresis, defined as the difference between the derecruitment current on the descending branch and the recruitment current on the ascending one, varied with the time constant of the slow inactivation of the sodium current. It was maximal for 4 s. The hysteresis progressively decreased when the time constant was further increased to almost disappear for 60 s.

The clockwise hysteresis is sensitive to the ramp velocity. Increasing the ramp velocity 10 times (to 5 nA/s) while keeping the inactivation time constant fixed led to a more symmetrical I - F curve. Spike height was less reduced, and the primary range expanded at the expense of the subprimary range (data not shown). This is because slow inactivation varies much less during the 5 nA/s triangular ramp than during the 0.5 nA/s ramp, indicating again that MMOs (and the subprimary range) strongly depend on membrane excitability.

Adding a slow M-like potassium current that activates in the subthreshold voltage range with a time constant of 3 s also elicits a

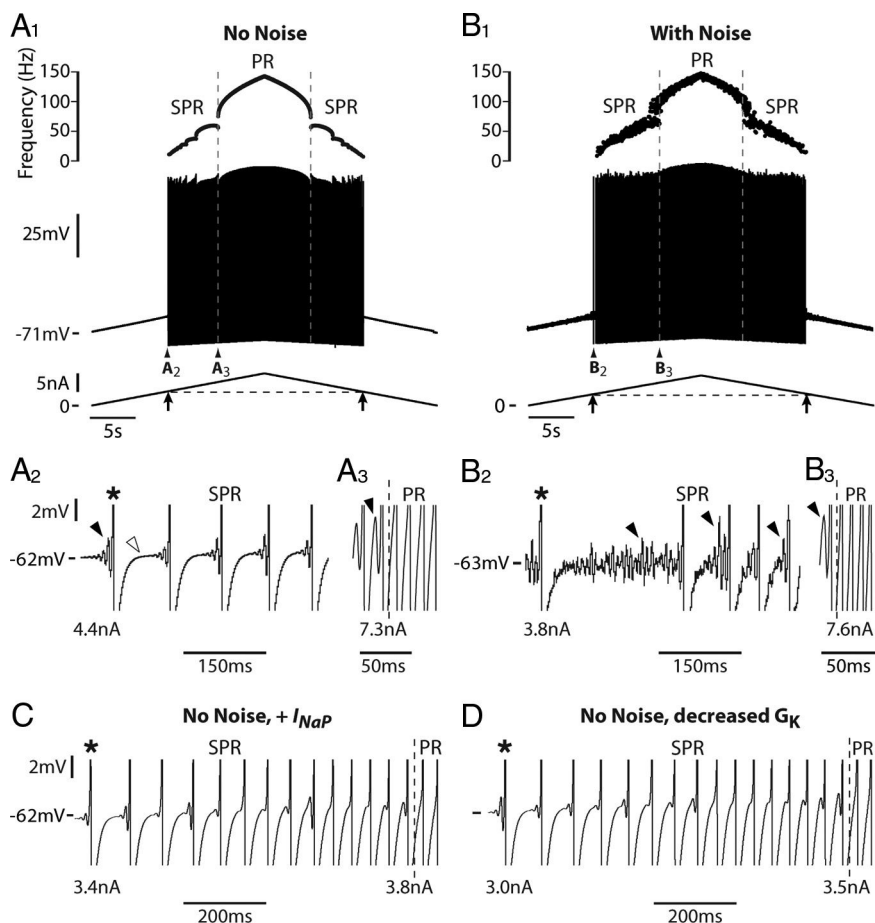


Figure 3. MMOs and a subprimary firing range occur in the basic model. **A1**, Response of the model to a triangular current ramp (0.5 nA/s, 10 nA amplitude). Same arrangement as in Figure 1A. The dashed vertical lines indicate the transitions from subprimary range (SPR) to primary firing range (PR) on the ascending ramp (SPR width 2.9 nA) and from PR to SPR on the descending ramp. **A2**, Magnification of the voltage trace at firing onset (truncated spikes). Note that subthreshold oscillations (black arrowhead) appear before the first action potential (asterisk, recruitment current 4.4 nA). The open arrowhead points out to the voltage plateau that follows the AHP relaxation. **A3**, Magnification at the transition from the SPR to the PR (7.3 nA). Note that the time scale is three times faster than in **A2**. The oscillations (black arrowhead) totally disappear after the transition. **B1**, Same as in **A1** with white noise added to the injected current. **B2**, **B3**, Magnification of the voltage trace at the firing onset (**B2**) and at the transition from the SPR to PR (**B3**). Note the fluctuations of the voltage and the substantial variations of interspike intervals in the SPR (**B2**). Subthreshold oscillations (black arrowhead) follow the AHP decay and progressively disappear during the SPR (**B2**). Recruitment current is 3.8 nA and transition from SPR to PR (dashed line) occurs at 7.6 nA. The SPR width is increased to 3.8 nA compared with **A**. **C**, Same as in **A** (no noise) except that a persistent component was added to the sodium current (I_{NaP} ; conductance 0.5 μ S). Magnification of the voltage response near firing onset. The recruitment current is 3.4 nA, i.e., smaller than in **A**, indicating an increased excitability. The transition from the SPR to the PR occurs at 3.8 nA. The width of the SPR is thus 0.4 nA, i.e., much smaller than in **A**. **D**, Same as in **A** except for the conductance of the delayed rectifier current (G_K), which was reduced to 3 μ S (instead of 3.5 μ S in **A**). Magnification of the voltage response near firing onset. The recruitment current is 3.0 nA, and the current at the transition from the SPR to the PR (dashed line) is 3.5 nA. Therefore, the width of the SPR is 0.5 nA, again much smaller than in **A**.

clockwise hysteresis of the I - F curve with a similar dependence on ramp velocity (data not shown). However, the amplitude of spikes does not decrease, contrarily to the effect of slow sodium current inactivation. This strongly suggests that the clockwise hysteresis observed in real motoneurons during slow ramps of current (Figs. 1, 6A) is largely due to the slow inactivation of the sodium current, although slow potassium currents may also play some part.

The AHP can paradoxically increase membrane excitability and reduce MMOs

The AHP interacts with the slow inactivation of the sodium current to set the excitability and thereby the firing pattern. Increasing 10 times the AHP conductance in the model dramatically changed the pattern of discharge (Fig. 5, compare A, 0.1 μ S; B, 1 μ S). The subprimary firing range and the hysteresis were nearly

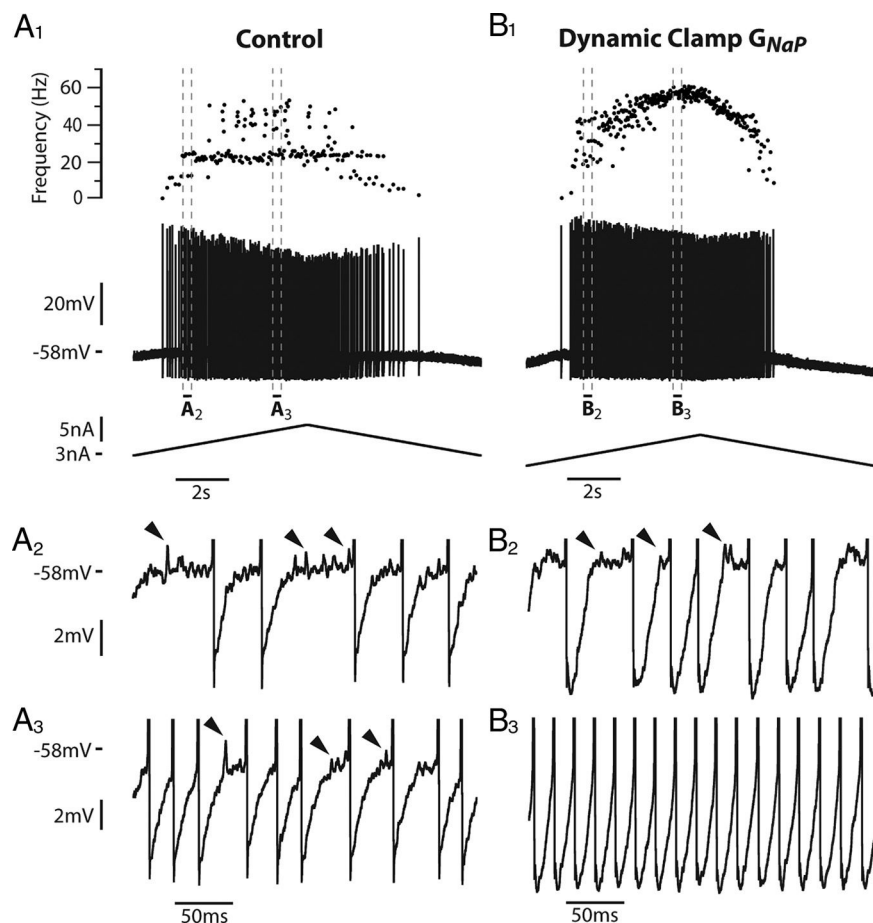


Figure 4. Adding an artificial persistent sodium current with dynamic clamp creates a primary firing range (PR) and decreases the subprimary range (SPR) in a real motoneuron. **A1**, Response of the motoneuron to a slow ramp of current (9 nA amplitude, 1 nA/s, control condition without dynamic clamp). The recruitment current was 3.5 nA. The discharge remained in the SPR during the whole ramp. Note the great variability in the frequencygram. **A2**, **A3**, Magnifications of the voltage trace (between the two pairs of dashed vertical lines in **A1**, truncated spikes) showing the fast oscillations (arrowheads), which account for the variability of the interspike intervals. **B1**, Response of the motoneuron in dynamic clamp (7 nA amplitude, 1 nA/s, artificial $G_{NaP} = 0.025 \mu S$). The recruitment current was reduced to 1.6 nA, indicating an increased excitability when the artificial persistent current was added. A firing range with little variability appeared in the frequencygram. **B2**, Magnification of the voltage trace at the beginning of the ramp (between the two dashed vertical lines in **B1**) showing the fast oscillations (arrowheads). **B3**, Magnification of the voltage trace for a higher current intensity (between the second pair of dashed lines in **B1**) showed no oscillations, as expected in the PR. A PR was thus created at the expense of the SPR, whose width decreased. This PR was observed despite the smaller ramp amplitude compared with control. It was entirely due to the addition of the artificial persistent sodium current. The input resistance of this motoneuron was $1.4 M\Omega$.

abolished (see I - F curve on Fig. 5B2). Moreover, the spike amplitude remained almost constant. Increasing the AHP de-inactivated substantially the sodium current: the slow inactivation variable decreased to only 0.76 at the end of the ascending ramp for the $1 \mu S$ AHP conductance (Fig. 5B1) versus 0.56 for the $0.1 \mu S$ AHP conductance (Fig. 5A1). Increasing the AHP conductance made the model more excitable, and consequently MMOs and hysteresis disappeared.

This prediction of the model was experimentally validated in two mouse motoneurons using dynamic clamp. In control conditions (Fig. 6A), the discharge of the illustrated motoneuron in response to a 0.1 nA/s triangular ramp of current was strongly asymmetrical: the derecruitment current was 1.4 nA larger than the recruitment current, the spike amplitude substantially decreased during the ascending ramp and remained low during the descending ramp. Figure 6B shows that adding an artificial AHP conductance of $0.4 \mu S$ (on top of the one naturally present) tended to suppress the MMOs (Fig. 6,

compare **B2**, **A2**) and to make the discharge symmetrical (Fig. 6B1). Moreover, the spike amplitude remained nearly constant throughout current injection. Similar results were found in the other motoneuron. These experimental results are in keeping with the model and again strongly suggest that the sodium current is endowed with slow inactivation properties in mouse motoneurons. This inactivation lowers membrane excitability, favoring the appearance of MMOs, and it is largely responsible for the clockwise hysteresis of the I - F curve. Although the AHP current is hyperpolarizing and reduces the firing frequency, it favors primary range firing because it paradoxically increases the motoneuron excitability by de-inactivating the sodium current.

Origin of the counterclockwise hysteresis

The counterclockwise hysteresis appears in our model when the following conditions are met: the time constant of the sodium current slow inactivation is shorter than 1.5 s (and longer than 50 ms, i.e., five times the AHP time constant) and the AHP conductance is larger than $0.7 \mu S$. In Figure 7A, the slow inactivation time constant was reduced to 0.6 s (i.e., five times less than in Fig. 5A) but the AHP conductance was kept at $0.1 \mu S$ (i.e., the same conductance as in Fig. 5A). The model fired only a few spikes during the ascending ramp (Fig. 7A), and the last spike was followed by long lasting subthreshold oscillations. This is because the inactivation time constant was small enough to allow for a strong inactivation of the sodium current (54% at the end of the ascending ramp), thus creating a low excitability state. When the AHP conductance was increased to $1 \mu S$ (Fig. 7B), it substantially de-inactivated the sodium current, and the model exhibited a sustained discharge (Fig. 7B1). However, the discharge pattern was not symmetrical: the derecruitment current was smaller (2.0 nA) than the recruitment current (3.1 nA), and the I - F curve displayed a counterclockwise hysteresis (Fig. 7B2). This is because de-inactivation of the sodium current by the AHP was larger at the discharge termination ($h_s = 0.79$) than at the discharge onset (0.72). A small subprimary firing range occurred at the discharge onset (Fig. 7B3) during the dip displayed by h_s (Fig. 7B1) and at discharge termination.

A Shilnikov's homoclinic bifurcation underlies MMOs

The purpose of the present section is to understand, using dynamical systems theory, which mathematical scenario underlies the appearance of MMOs when the membrane is hypoexcitable, and what explains the switch from subprimary to primary range as the injected current is increased. For the sake of simplicity, we illustrate only what happens in the reduced model (see Material and Methods) and in the absence of noise. Adding a slow com-

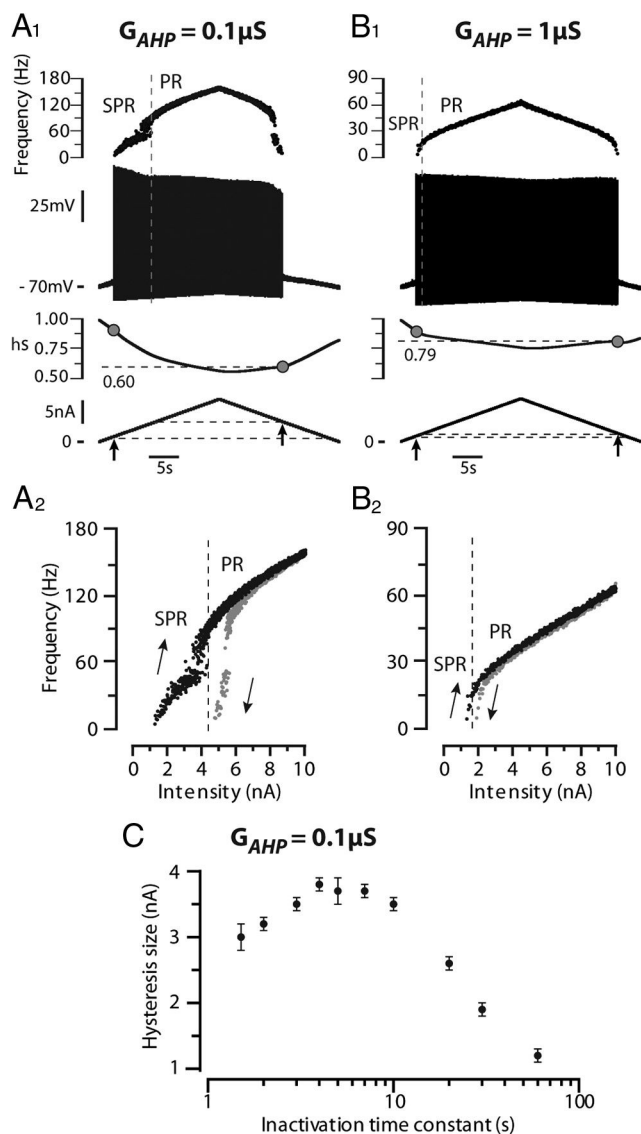


Figure 5. Adding a slow sodium current inactivation to the model creates a clockwise hysteresis. The transient sodium current was endowed with a slow inactivation process (3 s time constant) that added to the fast inactivation (1 ms) already present. The subsequent reduction in excitability was compensated by introducing a persistent sodium current (conductance $2.5 \mu\text{S}$) with similar slow inactivation. **A1**, Response to a slow triangular ramp of current (0.5 nA/s , amplitude 10 nA) when the AHP conductance was set to $0.1 \mu\text{S}$. From top to bottom: instantaneous firing frequency, voltage response, slow inactivation variable (hs, see Materials and Methods) and injected current. Note the reduction of the spike amplitude during the ascending ramp. The gray dots on the inactivation curve point to the inactivation at firing recruitment on the ascending ramp and derecruitment on the descending ramp. PR, Primary firing range; SPR, subprimary firing range. **A2**, I - F curve. Note the large clockwise hysteresis of the I - F relationship. **B1**, **B2**, Response when the AHP conductance was increased 10 times (to $1 \mu\text{S}$). Same arrangement as in **A1** and **A2**. Note that the spike amplitude decreases much less, there is less slow inactivation, the subprimary range is narrower, and the hysteresis has almost vanished. **C**, Size of the hysteresis (i.e., difference between derecruitment and recruitment currents) plotted against the time constant of slow inactivation of the sodium current. The AHP conductance was $0.1 \mu\text{S}$. Each point is the average of five simulations, and the vertical bar on each point is the SD. The abscissa is in logarithmic scale.

ponent to the inactivation of the fast activating sodium current, a slowly activating potassium current or a persistent sodium current does not qualitatively change the scenario that emerges from our analysis.

MMOs occur because two conditions are satisfied: (1) the model has a fixed point that is stable at the resting potential but, following a subcritical Hopf bifurcation, displays a spiral type

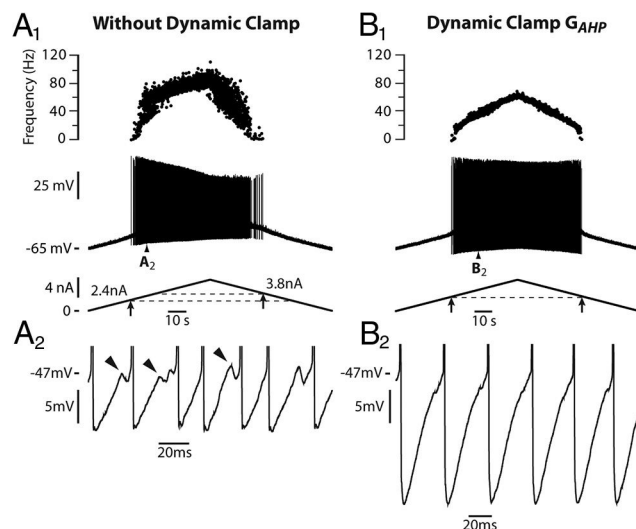


Figure 6. Increasing the AHP reduces both the MMOs and the clockwise hysteresis in a real motoneuron. **A1**, Response to a slow triangular ramp of current (0.1 nA/s , 6.7 nA amplitude). Same arrangement as in Figures 1A, 2A. Note the substantial decrease of spike amplitude during the ascending ramp. The discharge was asymmetric, the derecruitment current being larger (3.8 nA) than the recruitment current (2.4 nA), i.e., the I - F relationship displayed a clockwise hysteresis (data not shown). **A2**, Magnification of the voltage (truncated spikes) showing the fast subthreshold oscillations and the irregularity of the discharge. **B1**, Response when an artificial AHP (conductance $0.4 \mu\text{S}$) was added to the natural one using dynamic clamp. Note that the spike amplitude remained nearly constant throughout the ramp and that the clockwise hysteresis disappeared (equal recruitment and derecruitment currents). **B2**, Magnification of the voltage trace showing that the subthreshold oscillations were much reduced compared with the large oscillations observed without the artificial AHP. Moreover the discharge became much more regular. The input resistance of this motoneuron was $5.0 \text{ M}\Omega$.

instability in the subprimary range, and (2) this fixed point is revisited each time a spike has been fired. This is illustrated in Figure 8A. The tridimensional trajectory of our model during a typical period in the subprimary firing range is shown in Figure 8A1. After a spike is fired, the trajectory goes back to the V , W plane (see enlargement in Fig. 8A2) because the AHP has time to fully relax and its activation variable z decreases to 0 (Fig. 8A3). The trajectory reaches the fixed point of the model, i.e., the intersection of the two nullclines in the V , W plane (Fig. 8A4). However, because this fixed point is unstable, the trajectory of the model spirals away from it, and a new spike is fired (Fig. 8A1,A2). Fast oscillations are due to the existence of this unstable focus, and MMOs are associated with the existence of a trajectory that leaves this unstable fixed point but then returns to it because of the AHP decay. Such a trajectory is called a homoclinic trajectory. Accordingly, the mathematical scenario for the emergence of MMOs, where the fixed point becomes unstable through a subcritical Hopf bifurcation while a homoclinic trajectory arises, is called the Shilnikov's homoclinic bifurcation scenario. The transition from quiescence to MMOs is indicated in the bifurcation diagram of Figure 8C.

The firing frequency increases with the injected current. The transition from the subprimary firing range to the primary range occurs at 7.3 nA (Fig. 8C). It occurs because the fixed point becomes more and more unstable (i.e., it takes less and less time to spiral away from it) and, importantly, because the AHP begins to saturate. When the interspike intervals become too small for the AHP to relax (Fig. 8B2), the fixed point is no longer reached before the emission of the next spike and the trajectory of the system stays away from it in the z direction (Fig. 8B1). MMOs are no longer present, and the primary range is reached.

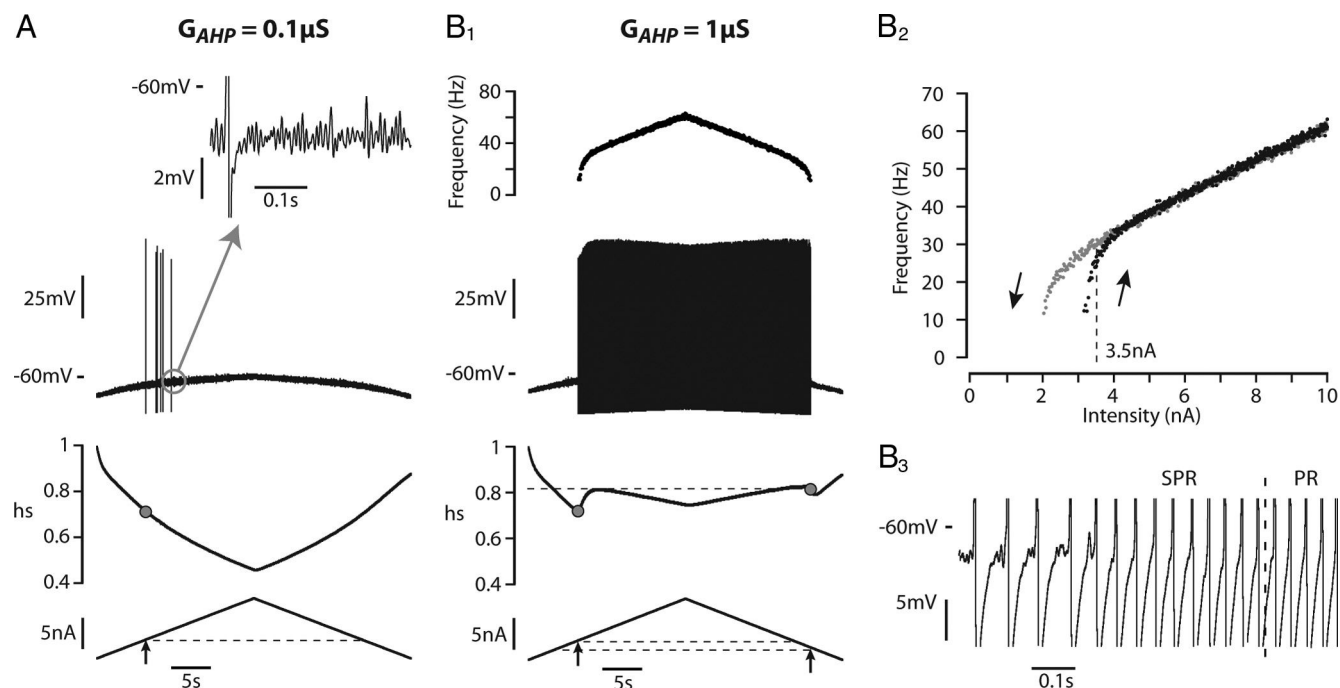


Figure 7. Counterclockwise hysteresis in the model. **A**, The time constant of the slow inactivation of the sodium current was reduced to 0.6 s and the AHP conductance set to 0.1 μS . Top, Voltage response; middle, slow inactivation variable; bottom, injected current. A few spikes only were emitted and they were followed by sustained fast oscillations as shown on the enlargement of the circled area. **B1**, The AHP conductance was increased to 1 μS . Same arrangement as in Figure 7A1. Note that there is less slow inactivation than in **A** and that the discharge is sustained. The gray dots on the inactivation curve indicate the values of h_s at recruitment and derecruitment. **B2**, I - F curve. Note the counterclockwise hysteresis. **B3**, Magnification of the voltage response at the transition from the subprimary range (SPR) to the primary firing range (PR).

The above scenario no longer occurs for high membrane excitability (larger ratio of sodium over potassium currents). The nullcline $dV/dt = 0$ then becomes strongly N-shaped and intersects the nullcline $dW/dt = 0$ in three points instead of one. The lower fixed point, stable at the resting potential, remains stable when the injected current is increased, and it disappears at discharge onset where it merges with the middle fixed point. Contrary to the hypoexcitable case, there is no current range where the model possesses a fixed point with a spiral instability, which is why no MMOs are observed.

Finally, the mathematical analysis allows us to compute the frequency of the fast oscillations, given by Equation 24 in Materials and Methods, and to understand which parameters determine them. The oscillation frequency is always high (typically 110 Hz for the standard value of parameters) and little depends on the voltage, in keeping with previous experimental results (Manuel et al., 2009). In contrast, it substantially depends on the passive membrane time constant and on the membrane repolarization kinetics (W variable). It increases by 50% every time τ_m is divided by two, and presents a similar, albeit lesser, sensitivity to the recovery time constant τ_r (the common value of τ_h and τ_n , see Materials and Methods).

Discussion

We show (1) that the fast subthreshold oscillations observed in spinal mouse motoneurons are due to the fast sodium and potassium currents involved in spike generation, and (2) that mixed mode oscillations occur each time the membrane is in a low excitability state. Slow inactivation of the sodium current largely contributes to this state. It reduces the sodium current available for spiking, giving rise to a large subprimary range with numerous oscillations between spikes. It also explains the clockwise hysteresis of the I - F curve observed in most mouse motoneurons.

On the contrary, in motoneurons displaying a counterclockwise hysteresis of the I - F curve, it is likely that slow inactivation is substantially reduced by the AHP, thus resulting in a more excitable state. This could explain why these motoneurons display only a small subprimary firing range with few oscillations between spikes. Altogether, MMOs and a subprimary firing range arise when the AHP current does not sufficiently de-inactivate the sodium current and a low excitability is achieved.

Mechanism for MMOs

In our model, MMOs are explained by the Shilnikov's homoclinic bifurcation scenario. This is the first time to our knowledge that this scenario is invoked to explain MMOs in neurons. It relies on the separation of role between the fast spike-generating currents that are responsible for the high-frequency subthreshold oscillations and the much slower AHP that brings the fast currents back to equilibrium. Other neuron models do not display similar features and their MMOs are explained by different scenarios (Krupa et al., 2008; Rubin and Wechselberger, 2008; Harish and Golomb, 2009). For instance, MMOs can be obtained in the Hodgkin-Huxley model without AHP. They involve the generalized Canard scenario that requires two slow variables. This is achieved by slowing down the kinetics of the recovery variables h and n (Rubin and Wechselberger, 2008). This is not relevant for mouse motoneurons that are characterized by fast spike kinetics [mean half-width of 0.3 ms (Manuel et al., 2009)], indicating both a fast inactivation of the sodium current and a fast activation of the delayed rectifier current. In other models (Gutfreund et al., 1995), the subthreshold oscillations are at low frequency and directly associated with a membrane resonance involving a slow potassium current, at variance with mouse motoneurons where the low-frequency resonance and the fast oscillations are not linked. Rather similarly, Harish and Golomb (2009) explained MMOs in vibrissa motoneurons by

noise-induced spikes on top of stable subthreshold oscillations. This is quite different from our scenario where the subthreshold oscillations are unstable and noise is not required to elicit spikes.

A matter of membrane excitability

A slow inactivation of the sodium current is likely responsible for the low membrane excitability of mouse motoneurons. Sodium channels are endowed with multiple time constants for their slow inactivation, ranging from 100 ms to 3 min (Hille, 2001), the molecular mechanisms of which are still largely unknown (Ulbricht, 2005). Slow inactivation of sodium currents has been implicated as a contributing factor to the firing rate adaptation of spinal motoneurons during sustained discharge (Kernell and Monster, 1982; Powers et al., 1999). In particular, a slow inactivation with a time constant of 130 ms accounts for the early phase of the spike frequency adaptation (Miles et al., 2005). Interestingly, frequency adaptation is accompanied by a decrease in spike amplitude (Powers et al., 1999). Moreover, the clockwise hysteresis of the I - F curve, observed in response to a slow triangular ramp of current, is characteristic of motoneurons with late firing rate adaptation [type 2 in the studies by Bennett et al. (2001), Button et al. (2006)]. When an inactivation process with a time constant larger than 1.5 s is incorporated in our model, the amplitude of the spikes decreases during the ascending ramp, a large subprimary firing range with MMOs is present, and the discharge displays a clockwise hysteresis pattern. These features are present when the ramp is slow (0.5 nA/s) and are substantially reduced when the ramp velocity is increased 10 times. This indicates that the slow inactivation of the sodium current likely decreases the membrane excitability at a level low enough to induce MMOs in mouse motoneurons. Frequency adaptation and MMOs thus appear as two facets of the same underlying biophysical mechanism.

Our simulations show that an M-like current, with the same time constant as the slow inactivation of the sodium current, also induces a clockwise hysteresis of the I - F curve. Such a current is present in turtle spinal motoneurons (Alaburda et al., 2002), and KCNQ channels, which underlie the M current, are expressed at the axon initial segment of mouse motoneurons where spikes are generated (Pan et al., 2006). The M-like current certainly plays a role in reducing the motoneurons excitability, but it cannot account for the reduction of spike amplitude.

The AHP, whose typical relaxation time constant is 10 ms in mouse motoneurons (Manuel et al., 2009), tends to oppose the slow inactivation of the sodium current. This de-inactivating effect increases the number of available sodium channels and makes the membrane more excitable, thus reducing MMOs. If

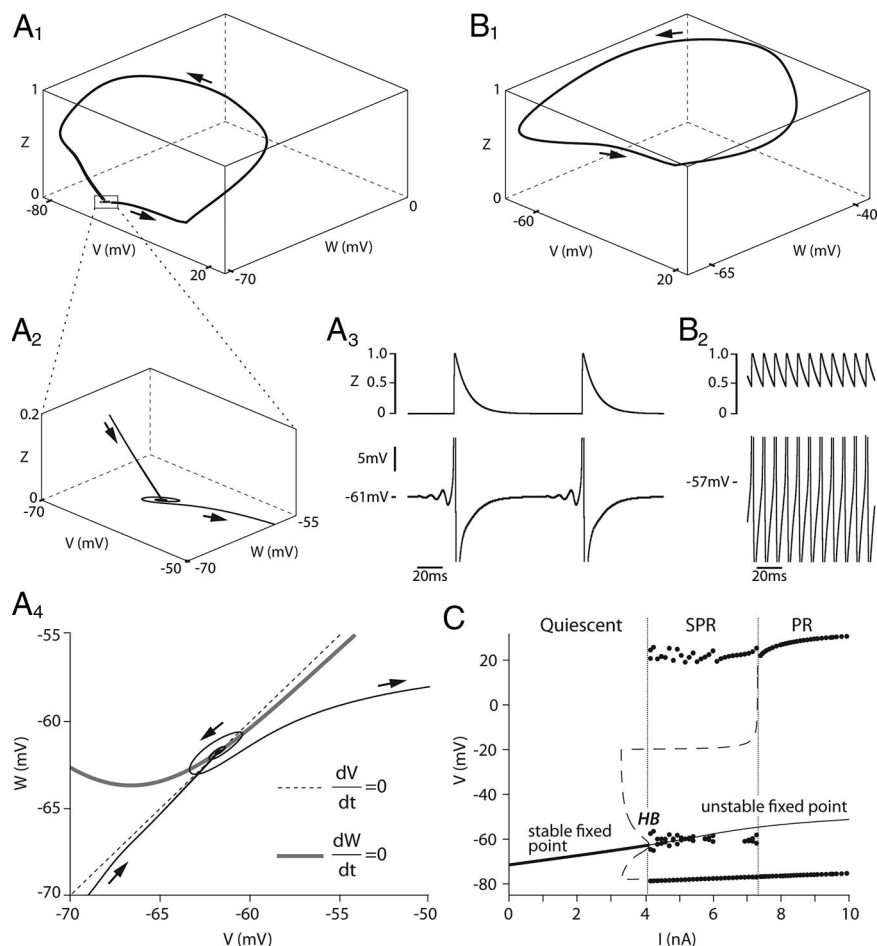


Figure 8. The Shilnikov's homoclinic bifurcation scenario. **A1**, Trajectory of the reduced model during a typical period in the subprimary range (SPR). The trajectory $[V(t), W(t), z(t)]$ is plotted in the three-dimensional V, W, z space. V is the voltage, W the recovery variable (see Materials and Methods), and z the activation variable of the AHP conductance. The arrows show motion direction on the three-dimensional trajectory. **A2**, Magnification of the trajectory (box in **A1**) when it revisits the unstable focus on the V, W plane. Note the spiral made by the trajectory around this focus. **A3**, Time evolution of the voltage (bottom trace) and of the AHP activation (z , top trace). Note the MMOs on the voltage. Note also that z fully relaxes to 0 during the interspike interval well before the next spike is fired. **A4**, The two nullclines $dV/dt = 0$ (dashed line) and $dW/dt = 0$ (gray line) are drawn in the V, W plane (i.e., the $z = 0$ plane). The trajectory spirals around the intersection of the two nullclines, i.e., the fixed point of the model. **B1**, Typical trajectory of the model in the primary firing range (PR). The trajectory stays away from the V, W plane where the unstable fixed point is located. **B2**, Time evolution of the voltage and z . Given the high discharge frequency, z has no time to relax between spikes. **C**, Bifurcation diagram of the model: the voltage of the stationary solution, both stable and unstable, is displayed as a function of the injected current. In the quiescent regime, the model displays a stable fixed point (solid line). This fixed point becomes unstable at 4.1 nA (first vertical line) through a subcritical Hopf bifurcation (HB) when it merges with an unstable, and thus not experimentally observable, periodic solution (thin dashed line). The model then displays MMOs with an alternation of subthreshold oscillations (the dots near the unstable fixed point indicate their minimum and maximum voltage) and full blown spikes (the series of upper and lower dots show their minimum and maximum voltage). The variations in the peak amplitude of spikes correspond to the successive frequency plateaus in the SPR. At 7.3 nA (second vertical line), the subthreshold oscillations and the unstable periodic solution disappear, and the model enters the PR.

the AHP is large enough, the membrane becomes too excitable to produce MMOs, as seen in our dynamic clamp experiments. This is perhaps why MMOs have never been observed in cat motoneurons: the mean AHP is 5.2 mV at the resting potential versus 2.8 mV in mouse motoneurons (Manuel et al., 2009). In line with this suggestion, MMOs tended to appear in experiments where the calcium chelator BAPTA was injected into a cat motoneuron to reduce the activation of SK channels (M. Manuel and D. Zytnicki, unpublished observations). Slow voltage-dependent potassium currents activated by the spikes, like a slow delayed rectifier current (not incorporated in our model), might add to the effect of the AHP and also contribute to the de-inactivation of the sodium current.

Our work suggests that MMOs depend on the excitability state. One may thus wonder whether barbiturate anesthesia, which alters the inactivation properties of sodium channels (Wartenberg et al., 1999), might induce MMOs. This is unlikely because MMOs have never been reported in motoneurons of barbiturate anesthetized cats. MMOs may also depend on neuro-modulation, which increases membrane excitability. For instance, an enhancement of the persistent sodium current will suppress MMOs. Calcium persistent inward currents (PICs) also alter excitability. They have been observed in spinal motoneurons of decerebrate and unparalyzed cats (Conway et al., 1988; Hounsgaard et al., 1988; Lee and Heckman, 1998a,b), in turtle, mouse, and rat spinal cord slices (Hounsgaard and Kiehn, 1989; Carlin et al., 2000), and recently in spinal motoneurons of rats anesthetized with ketamine–xylazine (Button et al., 2006; Hamm et al., 2010; Turkin et al., 2010) and of mice anesthetized with fentanyl–midazolam (Meehan et al., 2010). Calcium PICs contribute to shape the I – F relationship and may create a counterclockwise hysteresis [types 3 and 4 in the study by Bennett et al. (2001)]. In our study, calcium PICs are likely to be depressed, since the barbiturate anesthesia we used is known to block L-type calcium channels (Guertin and Hounsgaard, 1999). This is probably why we did not observe any type 4 I – F relationship, i.e., a counterclockwise hysteresis with discharge acceleration on the ascending ramp (Bennett et al., 2001). However, when calcium PICs are present they do not preclude the existence of a subprimary firing range and subthreshold oscillations (Turkin et al., 2010).

Heterogeneities of the intrinsic membrane properties

In our sample, 28% of mouse motoneurons display a counterclockwise hysteresis without any acceleration of the discharge in the primary range [type 3 behavior described by Bennett et al. (2001)]. Note that this happens although PICs are strongly depressed. In this firing pattern, the action potential amplitude little decreases, the width of the subprimary firing range is quite small, and few fast oscillations are observed. In our model, this occurs when the inactivation time constant of the sodium current is smaller than in simulations leading to a clockwise hysteresis, and when the AHP conductance is larger and de-inactivates more the sodium current, thus increasing excitability. Excitability can also be enhanced in the model by moving the threshold of the slow inactivation toward more depolarized values. This suggests that slow inactivation might be less important and operate on a shorter time scale in motoneurons displaying a counterclockwise hysteresis than in those displaying a clockwise hysteresis. Altogether, the slow inactivation properties of the sodium current are likely to be heterogeneous in mouse motoneurons, which might well be responsible for their different firing patterns.

In rat lumbar motoneurons, I – F relationships with a clockwise hysteresis were observed in motoneurons with the smallest input resistance whereas counterclockwise hystereses were observed in those with the highest input resistance (Button et al., 2006; Turkin et al., 2010). Similar results were found in the present study. This suggests a possible relation between the physiological type of the motoneuron and the firing pattern. Experiments in unparalyzed animals should allow us to elucidate the functional consequences of the subprimary firing range of motoneurons on the contraction of their motor unit.

References

- Abbot LF, Kepler T (1990) Model neurons: from Hodgkin–Huxley to Hopfield. In: Statistical mechanics of neural networks (Garrido L, ed), pp 5–18. Berlin: Springer.

- Alaburda A, Perrier JF, Hounsgaard J (2002) An M-like outward current regulates the excitability of spinal motoneurons in the adult turtle. *J Physiol* 540:875–881.
- Alonso A, Klink R (1993) Differential electroresponsiveness of stellate and pyramidal-like cells of medial entorhinal cortex layer II. *J Neurophysiol* 70:128–143.
- Bennett DJ, Li Y, Siu M (2001) Plateau potentials in sacrocaudal motoneurons of chronic spinal rats, recorded in vitro. *J Neurophysiol* 86:1955–1971.
- Boehmer G, Greffrath W, Martin E, Hermann S (2000) Subthreshold oscillation of the membrane potential in magnocellular neurons of the rat supraoptic nucleus. *J Physiol* 526:115–128.
- Bracci E, Centonze D, Bernardi G, Calabresi P (2003) Voltage-dependant membrane potential oscillations of rat fast-spiking interneurons. *J Physiol* 549:121–130.
- Brizzi L, Meunier C, Zytnicki D, Donnet M, Hansel D, d'Incamps BL, Van Vreeswijk C (2004) How shunting inhibition affects the discharge of lumbar motoneurons: a dynamic clamp study in anaesthetized cats. *J Physiol* 558:671–683.
- Button DC, Gardiner K, Marqueste T, Gardiner PF (2006) Frequency-current relationships of rat hindlimb alpha-motoneurons. *J Physiol* 573:663–677.
- Carlin KP, Jones KE, Jiang Z, Jordan LM, Brownstone RM (2000) Dendritic L-type calcium currents in mouse spinal motoneurons: implications for bistability. *Eur J Neurosci* 12:1635–1646.
- Conway BA, Hultborn H, Kiehn O, Mintz I (1988) Plateau potentials in alpha-motoneurons induced by intravenous injection of L-dopa and clonidine in the spinal cat. *J Physiol* 405:369–384.
- Ermentrout B (2002) Simulating, analyzing, and animating dynamical systems: a guide to XPPAUT for researchers and students. Philadelphia: SIAM.
- Guertin PA, Hounsgaard J (1999) Non-volatile general anaesthetics reduce spinal activity by suppressing plateau potentials. *Neuroscience* 88:353–358.
- Gutfreund Y, Yarom Y, Segev I (1995) Subthreshold oscillations and resonant frequency in guinea-pig cortical neurons: physiology and modelling. *J Physiol* 483 (Pt 3):621–640.
- Hamm TM, Turkin VV, Bandekar NK, O'Neill D, Jung R (2010) Persistent currents and discharge patterns in rat hindlimb motoneurons. *J Neurophysiol* 104:1566–1577.
- Harish O, Golomb D (2009) Control of firing patterns of vibrissa motoneurons by tonic modulation and phasic input: a modeling study. *Soc Neurosci Abstr* 35:659.3.
- Harish O, Golomb D (2010) Control of the firing pattern of vibrissa motoneurons by modulatory and phasic inputs: a modeling study. *J Neurophysiol* 103:2684–2699.
- Hille B (2001) Ionic channels of excitable membranes, Ed 3. Sunderland, MA: Sinauer.
- Hounsgaard J, Kiehn O (1989) Serotonin-induced bistability of turtle motoneurons caused by a nifedipine-sensitive calcium plateau potential. *J Physiol* 414:265–282.
- Hounsgaard J, Hultborn H, Jespersen B, Kiehn O (1988) Bistability of alpha-motoneurons in the decerebrate cat and in the acute spinal cat after intravenous 5-hydroxytryptophan. *J Physiol* 405:345–367.
- Kernell D, Monster AW (1982) Time course and properties of late adaptation in spinal motoneurons of the cat. *Exp Brain Res* 46:191–196.
- Klink R, Alonso A (1993) Ionic mechanisms for the subthreshold oscillations and differential electroresponsiveness of medial entorhinal cortex layer II neurons. *J Neurophysiol* 70:144–157.
- Krupa M, Popović N, Koppell N, Rotstein HG (2008) Mixed-mode oscillations in a three time-scale model for the dopaminergic neuron. *Chaos* 18:015106.
- Lee RH, Heckman CJ (1998a) Bistability in spinal motoneurons in vivo: systematic variations in rhythmic firing patterns. *J Neurophysiol* 80:572–582.
- Lee RH, Heckman CJ (1998b) Bistability in spinal motoneurons in vivo: systematic variations in persistent inward currents. *J Neurophysiol* 80:583–593.
- Llinás RR, Grace AA, Yarom Y (1991) In vitro neurons in mammalian cortical layer 4 exhibit intrinsic oscillatory activity in the 10- to 50-Hz frequency range. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:897–901.
- Manuel M, Meunier C, Donnet M, Zytnicki D (2006) The afterhyperpolar-

- ization conductance exerts the same control over the gain and variability of motoneurone firing in anaesthetized cats. *J Physiol* 576:873–886.
- Manuel M, Meunier C, Donnet M, Zytnicki D (2007) Resonant or not, two amplification modes of proprioceptive inputs by persistent inward currents in spinal motoneurons. *J Neurosci* 27:12977–12988.
- Manuel M, Iglesias C, Donnet M, Leroy F, Heckman CJ, Zytnicki D (2009) Fast kinetics, high-frequency oscillations, and subprimary firing range in adult mouse spinal motoneurons. *J Neurosci* 29:11246–11256.
- Meehan CF, Sukiasyan N, Zhang M, Nielsen JB, Hultborn H (2010) Intrinsic properties of mouse lumbar motoneurons revealed by intracellular recording in vivo. *J Neurophysiol* 103:2599–2610.
- Meunier C, Borejsza K (2005) How membrane properties shape the discharge of motoneurons: a detailed analytical study. *Neural Comput* 17:2383–2420.
- Miles GB, Dai Y, Brownstone RM (2005) Mechanisms underlying the early phase of spike frequency adaptation in mouse spinal motoneurons. *J Physiol* 566:519–532.
- Nguyen QT, Wessel R, Kleinfeld D (2004) Developmental regulation of active and passive membrane properties in rat vibrissa motoneurons. *J Physiol* 556:203–219.
- Pan Z, Kao T, Horvath Z, Lemos J, Sul JY, Cranstoun SD, Bennett V, Scherer SS, Cooper EC (2006) A common ankyrin-G-based mechanism retains KCNQ and NaV channels at electrically active domains of the axon. *J Neurosci* 26:2599–2613.
- Powers RK, Sawczuk A, Musick JR, Binder MD (1999) Multiple mechanisms of spike-frequency adaptation in motoneurons. *J Physiol Paris* 93:101–114.
- Raikov I, Preyer A, Butera RJ (2004) MRCl: a flexible real-time dynamic clamp system for electrophysiology experiments. *J Neurosci Methods* 132:109–123.
- Rubin J, Wechselberger M (2008) The selection of mixed-mode oscillations in a Hodgkin-Huxley model with multiple timescales. *Chaos* 18:015105.
- Sekerli M, Del Negro CA, Lee RH, Butera RJ (2004) Estimating action potential thresholds from neuronal time-series: new metrics and evaluation of methodologies. *IEEE Trans Biomed Eng* 51:1665–1672.
- Turkin VV, O'Neill D, Jung R, Iarkov A, Hamm TM (2010) Characteristics and organization of discharge properties in rat hindlimb motoneurons. *J Neurophysiol* 104:1549–1565.
- Ulbricht W (2005) Sodium channel inactivation: molecular determinants and modulation. *Physiol Rev* 85:1271–1301.
- Wartenberg HC, Urban BW, Duch DS (1999) Distinct molecular sites of anaesthetic action: pentobarbital block of human brain sodium channels is alleviated by removal of fast inactivation. *Br J Anaesth* 82:74–80.
- Wu N, Hsiao CF, Chandler SH (2001) Membrane resonance and subthreshold membrane oscillations in mesencephalic V neurons: participants in burst generation. *J Neurosci* 21:3729–3739.
- Wu N, Enomoto A, Tanaka S, Hsiao CF, Nykamp DQ, Izhikevich E, Chandler SH (2005) Persistent sodium currents in mesencephalic v neurons participate in burst generation and control of membrane excitability. *J Neurophysiol* 93:2710–2722.

Chapitre III - Altérations des propriétés des motoneurones au cours de la SLA

La sclérose Latérale Amyotrophique se caractérise par la dégénérescence spécifique des motoneurones spinaux et bulbaires ainsi que des neurones pyramidaux corticospinaux. Sur le plan clinique les manifestations les plus précoces de la maladie sont une fasciculation musculaire (tressautements involontaires), une spasticité et une faiblesse musculaire menant à une paralysie progressive. Chez ces patients SLA, l'analyse post-mortem des tissus révèle une atrophie de la moelle épinière. Cette atrophie résulte de la dégénérescence des voies corticospinales formant les cordons latéraux et d'une perte importante des motoneurones situés dans les cornes ventrales de la moelle épinière (Ghatak et al. 1986; Martin 1999). Cette neurodégénérescence est accompagnée d'une gliose, c'est à dire d'une prolifération anormale de cellules gliales formant une sclérose (Murayama et al. 1991; Kawamata et al. 1992; Schiffer et al. 1996). A l'heure actuelle, un seul traitement, le Riluzole, a été approuvé par la *Food and Drugs Administration* (FDA : Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux). Il ne permet malheureusement de prolonger la vie des patients que de quelques mois. En effet, lorsque les symptômes cliniques émergent chez le patient, un nombre significatif de motoneurones a déjà dégénéré (Wohlfart 1959; Swash & Ingram 1988). Ce délai entre le début de la dégénérescence et le diagnostic clinique pourrait être une des raisons de l'échec des nombreux tests cliniques concernant de nouveaux traitements ainsi que de la faible amélioration procurée par le Riluzole.

A / Modèles SOD1

Les médecins ont cherché des causes génétiques dans les formes familiales de la maladie (10% des cas) pour en comprendre ses mécanismes. Des mutations ponctuelles sur plusieurs gènes ont été décrites dans les cohortes de patients (Gros-Louis et al. 2006; Pasinelli & Brown 2006; Dunckley et al. 2007; Leblond et al. 2014). Parmi elles, des mutations autosomales (plus de 140; Turner & Talbot 2008) sur les exons 2 et 4 du gène

codant la superoxyde dismutase 1 (SOD1, chromosome 2) ont été retrouvées (Rosen et al. 1993) dans 20% des cas de forme familiale et 3% des formes sporadiques. Les mutations du gène SOD1 représentent ainsi la cause connue de la SLA la plus commune (Boillée & Cleveland 2008; Rothstein 2009; Andersen & Al-Chalabi 2011; Robberecht & Philips 2013). La SOD1 est exprimée de façon ubiquitaire dans les différents types cellulaires et bien conservée entre les espèces (Fridovich 1995). Son gène code pour une métalloprotéine également appelée « Cu/Zn superoxyde dismutase ». La protéine est localisée dans le cytoplasme, le noyau, les lysosomes et l'espace inter-membranaire des mitochondries (L. Y. Chang et al. 1988; Keller et al. 1991; Crapo et al. 1992; Sturtz et al. 2001). Lors de son fonctionnement normal, elle lie un ion zinc et un ion cuivre en son cœur et forme un homodimère dont la principale fonction est l'élimination de radicaux libres superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) dans la cellule. Elle les métabolise en dioxygène (O_2) et en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), protégeant ainsi les cellules contre le stress oxydatif (figure 10 A ; Fridovich 1986). Malgré la diminution de l'activité dismutase globale enregistrée chez les patients (Saccon et al. 2013) et les dommages oxydatifs observés dans les tissus post-mortem (Shaw et al. 1995; Shibata 2001), le niveau d'activité enzymatique de la SOD1 enregistré dans différentes mutations ne semble pas être corrélé à l'agressivité de la maladie (Borchelt et al. 1994; Ratovitski et al. 1999). De plus certaines mutations retrouvés chez les patients n'affectent pas ou même augmentent l'activité dismutase de la SOD1. Pour ces raisons, la maladie proviendrait plutôt d'un « gain de fonction toxique » des protéines SOD1 mutées par rapport à la protéine non mutée.

L'identification de ce gène chez les patients a permis l'élaboration de nouveaux modèles transgéniques de la maladie. Jusqu'à maintenant, le modèle le plus utilisé pour l'étude de la SLA est le modèle souris transgénique SOD1-G93A « high expressor » dans lequel plusieurs copies du gène humain de la SOD1 comportant une substitution de la Guanine en position 93 par l'Alamine sont introduits dans le génome de la souris (Gurney et al. 1994). Il existe également d'autres lignées de souris exprimant le gène SOD1 muté sur d'autres paires de bases azotées (G85R, G37R) et avec différents taux d'expression (G93A « low expressor »), ainsi que d'autres modèles transgéniques de la maladie plus récents, créés à partir de mutations sur d'autres gènes (FUS, TDP-43; Van den Bosh et al. 2011). Dans le modèle SOD1-G93A, la protéine mutée est exprimée de façon ubiquitaire mais déclenche une dégénérescence des motoneurons spécifiquement. S'en suit une paralysie musculaire progressive puis la mort des animaux à 5 ou 6 mois. Ce modèle

reproduit des caractéristiques cliniques et pathologiques similaires à la SLA humaine (Philip C. Wong et al. 2002).

Des lignées à expression conditionnelle du transgène dans certains tissus ont montré que l'expression du transgène dans d'autres types cellulaires que les motoneurones était nécessaire pour reproduire le phénotype complet de la maladie (Papadimitriou et al. 2010). Des lignées permettant l'excision du transgène dans certains types de cellules uniquement ont montré que c'était la production de SOD1 mutée par les motoneurones eux-mêmes et par les précurseurs d'oligodendrocytes NG2-positifs qui était responsable du déclenchement de la pathologie (Boillée et al. 2006b; Yamanaka et al. 2008; Wang et al. 2009). L'expression du transgène par les microglies (Boillée et al. 2006a) et par les astrocytes (Yamanaka et al. 2008) définit quant à elle la progression de la maladie (Ilieva et al. 2009). Le développement de la maladie est donc à la fois défini par des processus intrinsèques aux différents types cellulaires et par des processus impliquant une communication entre les différentes cellules (Boillée et al. 2006a).

B / Progression de la maladie dans le modèle SOD1-G93A

L'émergence des ces nouveaux modèles transgéniques a permis une meilleure compréhension de la progression de la pathologie, notamment des phénomènes précédant la paralysie. Les premiers signes moteurs observés chez les souris SOD1-G93A surviennent durant les premières semaines post-natales. A partir de P10, ces animaux montrent des défauts de mouvements de leurs pattes antérieures (placement sur un objet) et sont plus lents à se retourner lorsqu'ils sont placés sur le dos (van Zundert et al. 2008). Une chute de la force musculaire développée pour les muscles à contraction rapide (tibialis antérieur, extenseur digitorum longus, gastrocnémien médian) apparaît aux alentours de P40-50 alors que les muscles à contraction lente (soléaire) semblent épargnés (Hegedus et al. 2007). Cet âge correspond à l'apparition de défauts au cours de la locomotion et une diminution de la vitesse de course (Veldink et al. 2003; Wooley et al. 2005). Ces problèmes moteurs surviennent alors qu'une première vague de dénervation des unités motrices se produit ([Figure 10](#)). Elle concerne les fibres musculaires IIB des unités motrices FF (Pun et al. 2006; Fischer & Glass 2007; Gordon et al. 2007; Hegedus et al. 2008). Conjointement à cette dénervation, on observe une transition des fibres

musculaires IIB vers le type IIA et leur réinnervation par les unités motrices FR et S (Hegedus et al. 2008). A P80-90, survient une seconde vague de dénervation ([Figure 10](#)) concernant principalement les unités motrices FR (Fischer & Glass 2007; Hegedus et al. 2008). La paralysie du train arrière commence à être flagrante à cet âge. Les muscles lents jusqu'ici épargnés commencent alors à être affectés et la faiblesse musculaire progresse dans les muscles rapides (Hegedus et al. 2007). La dégénérescence à proprement parler des corps cellulaires des motoneurones les plus vulnérables ne commence qu'à partir de P100 (Fischer et al. 2004); les corps cellulaires des motoneurones S persisteront jusqu'aux stades terminaux de la maladie (Kanning et al. 2010). L'atteinte des motoneurones gamma est quant à elle incertaine (Swash & Fox 1974; Kanning et al. 2010). La paralysie complète des pattes postérieures et antérieures est atteinte respectivement à P125 et P135; la mort de l'animal suit peu après (Chiu et al. 1995).

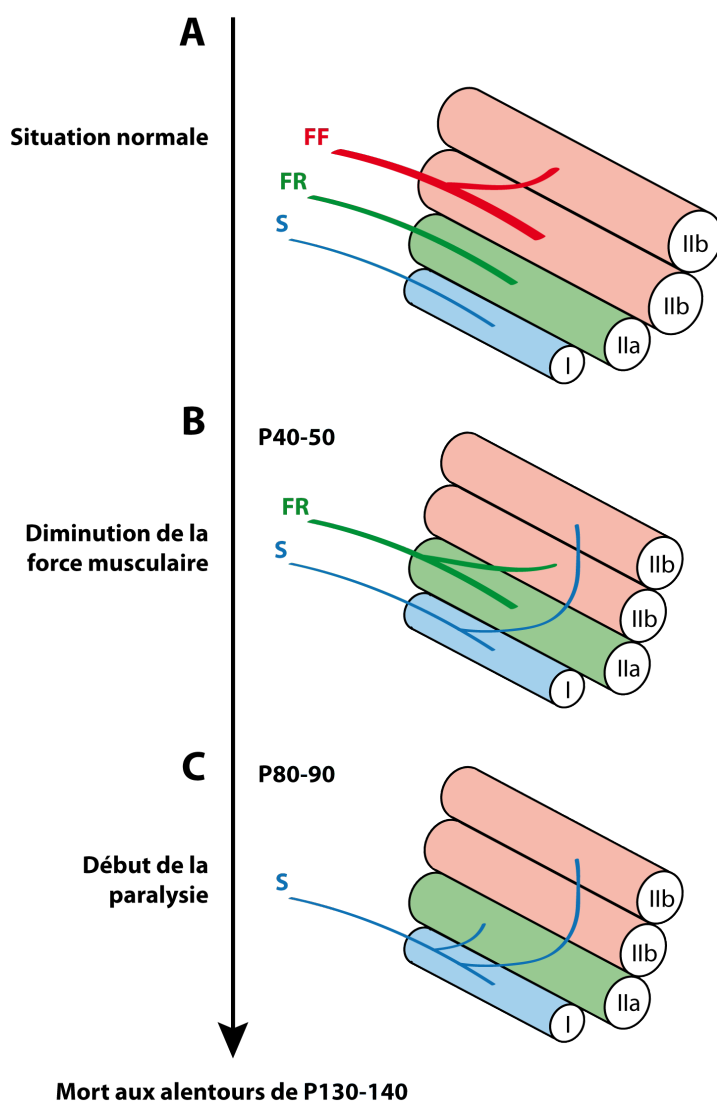


Figure 10 : Dénervation des jonctions neuromusculaires dans le modèle SOD1-G93A. A. Innervation normale des fibres musculaires I, IIA et IIB par les motoneurones S, FR et FF respectivement. B. Dénervation spécifique des fibres musculaires IIB accompagnée d'une atrophie musculaire dans la souris SOD1-G93A pré-symptomatique et réinnervation partielle de ces fibres par les motoneurones FR et S. C. Dénervation des unités motrices FR marquant le début de la paralysie.

Il est difficile de différencier les dérèglements physiologiques qui sont causaux dans la maladie de ceux qui reflètent au contraire des mécanismes compensatoires ayant des effets protecteurs. L'étude de ces dérèglements a toutefois permis de formuler de nombreuses hypothèses pour tenter d'expliquer la dégénérescence spécifique des motoneurones dans la SLA. Parmi elles, les principales invoquent des dommages oxydatifs (causés par les espèces réactives de l'oxygène) et nitrosatifs (causés principalement par NO^+), l'accumulation d'agrégats intracellulaires, des dysfonctions mitochondriales, l'altération du transport axonal, une déficience de facteurs de croissance, une implication des cellules gliales ou encore une excitotoxicité liée au glutamate. Ces hypothèses ne sont pas exclusives et peuvent impliquer des mécanismes agissant en parallèle et qui vont concourir conjointement à la dégénérescence des motoneurones.

a) Dommages oxydatifs et nitrosatifs

Bien que l'activité catalytique de la SOD1 soit préservée dans la plupart des mutations, la protéine mutée pourrait concourir à la dégénérescence des motoneurones en acquérant parallèlement une activité enzymatique toxique. Une augmentation des dommages oxydatifs et nitrosatifs a été observée dans les souris SOD1-G93A (Andrus et al. 1998) ainsi que chez les patients SLA (Bruijn et al. 1997a; Beal 2002). L'hypothèse d'un stress oxydatif médié par les mutations SOD1 est basé sur la possibilité que les modifications structurelles de la protéine mutée pourrait exposer son site actif (i. e. son cœur cuivre-zinc) à des substrats aberrants (Beckman et al. 1993). La protéine mutée pourrait catalyser la conversion du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en radicaux libres hydroxyle (HO^\cdot) (Wiedau-Pazos et al. 1996) ou utiliser le peroxynitrite (ONOO^\cdot) comme substrat pour la nitration des protéines (Figure 11 ; Beckman et al. 1993), provoquant ainsi une cascade de dommages toxiques sur les membranes, les protéines et l'ADN.

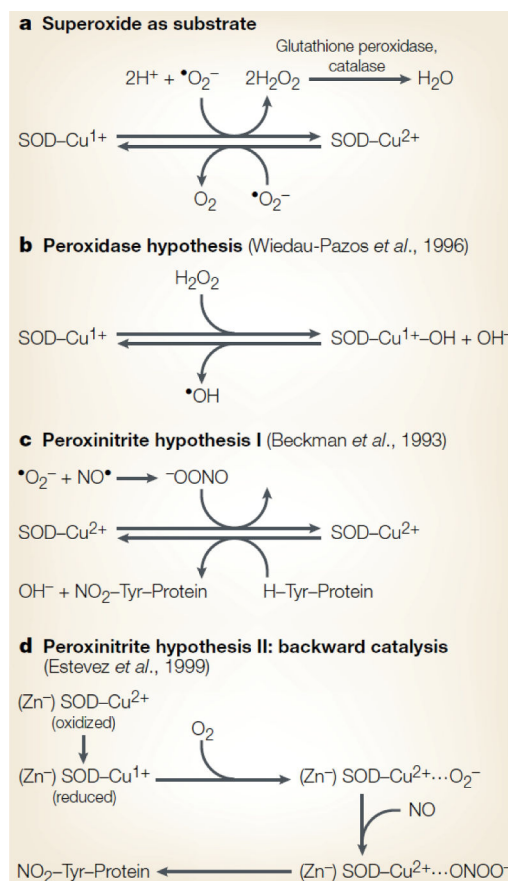


Figure 11 : Hypothèses sur le gain de fonction toxique de la SOD1 mutée. A. activité normale de la SOD1 : dismutation des ions superoxyde. B-D. Mécanismes proposés pour la toxicité de la SOD1 mutée B. Formation de radicaux hydroxyle à partir du peroxyde d'hydrogène C. Catalyse de la nitration de la tyrosine par le peroxynitrite. D. Génération d'ions superoxyde et de peroxynitrite. Adaptée de Cleveland and Rothstein 2001.

b) agrégats intracellulaires

Comme c'est le cas dans de nombreuses pathologies neurodégénératives (maladie de Parkinson, chorée de Huntington...), l'agrégation de protéine mutée est un des mécanismes par lequel la SOD1 mutée pourrait acquérir sa toxicité (Bruijn *et al.* 1998). Des agrégats de protéine SOD1 ont en effet été observés dans la forme familiale de la maladie ainsi que dans les motoneurones des modèles mSOD1. La formation de ces inclusions cytoplasmiques semble de plus précéder ou coïncider avec l'apparition des symptômes et s'accumuler avec la progression de la maladie. Ce phénomène pourrait constituer un événement précoce de la maladie. L'agrégation intracellulaire de protéines SOD1 peut entraîner la dégénérescence des motoneurones par différentes voies, incluant la séquestration de composants cellulaires (Bruijn *et al.* 1998), la réduction de l'activité des protéines chaperonnes (Bruening *et al.* 1999) et des dysfonctions dans la formation du

complexe ubiquitine-protéasome (Niwa et al. 2002) par lequel la cellule dégrade ses déchets métaboliques. Des agrégats contenant ces complexes ubiquitin-protéasome ont en effet été observés à la fois dans les formes sporadiques et familiales de la maladie (Niwa et al. 2002; Deng et al. 2011). Des inclusions cytoplasmiques riches en protéines TDP-43 (dont le gène est muté dans certains cas de SLA) ont également été identifiées chez certains patients (Van Deerlin et al. 2008) et confortent l'hypothèse de l'implication de tels agrégats dans la physiopathologie de la SLA.

c) dysfonctions mitochondriales

Des anomalies structurales des mitochondries ont été observées chez les patients SLA (Menzies et al. 2002) et des mutations du gène du cytochrome C (protéine mitochondriale ; Comi et al. 1998) et d'ARN de transfert mitochondriaux (Gillian M. Borthwick et al. 2006) ont été retrouvées chez certains d'entre eux, suggérant l'implication de dysfonctions mitochondriales dans la SLA. Les mitochondries sont responsables de la production de l'énergie nécessaire au métabolisme cellulaire par respiration et sont impliquées dans la régulation des niveaux de calcium cytoplasmique. Leur altération pourrait constituer le lien entre l'augmentation des taux de calcium intracellulaire observés chez les patients (Siklós et al. 1996) et le stress oxydatif. Les motoneurones sont en effet très sensibles à l'inhibition du métabolisme mitochondrial, qui peut causer une élévation du taux de calcium intracellulaire couplée à une augmentation du stress oxydatif (Bergmann & Keller 2004). Or, des études ont montré une inhibition du complexe IV de la chaîne respiratoire des mitochondries dans la corne ventrale de patients SLA (Borthwick et al. 1999)

Dans le modèle SOD1-G93A, le gonflement et la vacuolisation des mitochondries apparaissent dès les stades pré-symptomatiques (Wong et al. 1995; Higgins et al. 2003; Martin et al. 2007). Divers mécanismes peuvent être envisagés pour expliquer des dommages mitochondriaux provoqués par les protéines SOD1 mutés, incluant un blocage des canaux membranaires des mitochondries ou encore une altération de la capacité en tampon calcique des motoneurones (Boillée et al. 2006b; Jaiswal & Keller 2009; Grosskreutz et al. 2010). Des observations en microscopie électronique ont révélé que la membrane externe des mitochondries restait relativement intacte dans la pathologie

(Higgins et al. 2003) alors que le *cristae* (membrane mitochondriale interne) et la matrice étaient profondément remodelés (Martin et al. 2009). Cette conformation permet une expansion de la membrane externe conduisant au gonflement des mitochondries et à l'expansion de l'espace inter-membranaire (Higgins et al. 2003). Ce mécanisme pourrait être relié à l'accumulation de protéines SOD1 dans l'espace inter-membranaire (Higgins et al. 2002; 2003). Ces changements morphologiques favorisent la formation des pores mitochondriaux (mPTP : mitochondrial Permeability Transition Pore), facteurs majeurs des processus de mort cellulaire programmée (Martin et al. 2009).

d) mort cellulaire par nécroptose

Dans la SLA, la dégénérescence des motoneurones se déroule suivant un mécanisme complexe qui exprime à la fois des caractéristiques apoptotiques et nécrotiques (Re et al. 2014; Pirooznia et al. 2014). La surexpression de la protéine Bcl-2 (Kostic et al. 1997), anti-apoptotique, aussi bien que l'inhibition de l'expression de la protéine Bax (Gould et al. 2006; Re et al. 2014), pro-apoptotique, permettent en effet de préserver les motoneurones dans les souris SOD1 et dans les cultures de tissus de patients SLA. Bax est une protéine mitochondriale qui induit normalement l'apoptose en perméabilisant leur membrane, s'en suit une libération du Cytochrome C contenu dans les mitochondries et l'activation des caspases. Cependant, les concentrations en Cytochrome C des tissus spinaux des patients SLA sont réduits par rapport aux sujets sains (Ilzecka 2007). De plus, malgré l'activation de certaines caspases (1,9 et 3) pro-apoptotiques observée dans les modèles SOD1 (Pasinelli et al. 2000; Guégan et al. 2001), ni l'inhibition des caspases 3, 7 et 8, ni celle de l'expression de la protéine p53, impliquées dans la voie apoptotique, ne permettent de protéger les motoneurones de patient SLA en culture (Re et al. 2014). Les motoneurones SOD1 perdent également l'intégrité de leur membrane plasmique en dégénérant, caractéristique de la nécrose. La dégénérescence des motoneurones dans la SLA semble donc être médiée par un mécanisme Bax-dépendant et caspases-indépendant. Il est devenu clair ces dernières années que l'apoptose n'était pas le seul mécanisme régulant la mort cellulaire : la nécroptose, une forme de nécrose programmée décrite récemment déclenche la mort cellulaire par l'activation de l'enzyme RIP1 (Ofengeim & Yuan 2013) de manière caspase-indépendante (Galluzzi et al. 2014). Or, l'inhibition de cette enzyme permet la protection des motoneurones de patients en

culture (Re et al. 2014). La nécroptose semble donc être le mécanisme par lequel les motoneurones dégénèrent au cours de la SLA.

e) altérations des neurofilaments et du transport axonal

Une accumulation de neurofilaments dans le corps cellulaire et la partie proximale de l'axone est caractéristique de la SLA. L'accumulation de neurofilaments est connue pour provoquer des dysfonctions sélectives des motoneurones (Xu et al. 1993; Lee et al. 1994). De façon intéressante, la surexpression de neurofilaments dans le modèle transgénique SOD1-G37R n'accélère pas la progression de la maladie mais prolonge la durée de vie des animaux (Couillard-Després et al. 2000). L'accumulation est, dans ces expériences, prononcée dans le corps cellulaire des motoneurones mais réduite dans les axones. L'accumulation dans le soma pourrait avoir un effet tampon sur les dommages cellulaires provoqués par la toxicité de la protéine SOD1 mutée (Couillard-Després et al. 2000; Nguyen et al. 2001). En contrepartie, la diminution de la quantité de neurofilaments dans l'axone pourrait protéger le motoneurone en facilitant le transport axonal. Cette hypothèse est supportée par le fait qu'un ralentissement du transport axonal ait été observé dès les stades pré-symptomatiques dans les modèles SOD1 (Williamson & Cleveland 1999). De plus, des mutations sur le gène de la dynactine, protéine impliquée dans le transport rétrograde, ont été répertoriées dans certains cas de SLA (Puls et al. 2003). Ces défauts de transport axonal peuvent conduire à des problèmes de transport rétrograde de facteurs trophiques libérés par les muscles à la périphérie ainsi qu'une plus faible mobilité des mitochondries le long de l'axone; leur gonflement jouant également un rôle négatif dans leur mobilité (Magrané et al. 2012).

f) facteurs de croissance

Un rôle potentiel du facteur de croissance vasculaire endothélial (VEGF) dans la physiopathologie de la SLA a émergé d'un modèle transgénique de souris dans lequel le gène codant le VEGF est muté (Oosthuyse et al. 2001). Dans ce modèle, le déficit de VEGF provoque des altérations motrices progressives et une dégénérescence spécifique des motoneurones entre 5 et 7 mois. Le mécanisme d'action du VEGF proposé inclut des

effets neuroprotecteurs directs et une habilité à réduire les dommages ischémiques par la régulation de la vascularisation. Le rôle protecteur du VEGF est supporté par la démonstration du ralentissement de la progression de la SLA dans les souris SOD1-G93A surexprimant le VEGF (Y. Wang et al. 2007) ou lors d'une administration chronique (Storkebaum et al. 2005; Azzouz et al. 2004). D'autres facteurs trophiques comme l'« Insulin-like Growth Factor-1 » (IGF-1; Kaspar et al. 2003) ou le « Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor » (GDNF; Acsadi et al. 2002) semblent également avoir des effets neuroprotecteurs et ralentissent la progression de la maladie dans le modèle SOD1-G93A.

g) Implication des cellules gliales

Comme énoncé plus haut (cf. « B / modèles SOD1 »), la dégénérescence des motoneurones n'est probablement pas un processus « cellule autonome » dans la SLA et impliquerait les cellules gliales avoisinantes. Bien avant la dégénérescence des motoneurones, une microgliose s'installe dans la moelle épinière des souris SOD1-G93A aux alentours de P30 (Saxena et al. 2009) et une gliose astrocytaire vers P50 (Fischer et al. 2004). Des inclusions astrocytaires ont également été reportées comme un indicateur précoce de la toxicité de la protéine SOD1 mutée. Elles précèdent l'apparition des symptômes et augmentent avec la progression de la maladie (Bruijn et al. 1997a). L'implication des glies dans la dégénérescence des motoneurones a été mise en évidence élégamment par une série d'études sur des modèles SOD1 « chimériques » où l'expression de la protéine mutée est restreinte à certains types cellulaires. Son expression limitée aux astrocytes (Gong et al. 2000) ou aux motoneurones (Pramatarova et al. 2001) ne suffit pas à induire les déficits moteurs chez la souris. Cependant, dans des modèles chimériques de co-culture motoneurones-astrocytes, la mort de motoneurones n'exprimant pas la mutation a été observée en présence d'astrocytes comportant la SOD1 mutée (Julien 2007; Nagai et al. 2007). La diminution de l'expression de la SOD1 mutée dans la microglie des souris SOD1-G37R permet de prolonger leur durée de vie d'une centaine de jours, sans pour autant retarder l'apparition de la maladie (Boillée et al. 2006a). Les mécanismes par lesquels les astrocytes et la microglie participent à la mort cellulaire des motoneurones impliqueraient des mécanismes inflammatoires médiés par la libération de facteurs toxiques (Julien 2007; Fritz et al. 2013; Pirooznia et al. 2014).

L'altération des oligodendrocytes, cellules qui myélinisent les motoneurones dans la moelle épinière, semble également impliquée dans la progression de la pathologie (Cho 2013). Une dégénérescence des oligodendrocytes et une prolifération anormale des cellules NG2+, précurseurs des oligodendrocytes, dans la moelle épinière des patients et des souris SOD1 pré-symptomatiques ont été observées (Kang et al. 2013). Cependant, bien que de nouveaux oligodendrocytes soient formés à partir des cellules NG2+, ils présentent des défauts dans leur maturation et échouent à remyéliniser efficacement les motoneurones. L'excision spécifique du gène muté dans les oligodendrocytes retarde substantiellement l'apparition de la maladie et prolonge la durée de vie des souris SOD1. D'où l'hypothèse selon laquelle les mutations SOD1 pourraient augmenter la vulnérabilité des motoneurones et accélérer la progression de la maladie en altérant directement la fonction des oligodendrocytes (Kang et al. 2013).

h) Excitotoxicité

L'excitotoxicité du glutamate pourrait être en cause dans la SLA en provoquant une entrée excessive et délétère de calcium dans le motoneurone (Cleveland & Rothstein 2001). La participation de ce mécanisme a été proposée lorsqu'une augmentation de la concentration en glutamate a été décelée dans le liquide cérébro-spinal des patients SLA (Rothstein et al. 1990). Cette augmentation, retrouvée chez 40% des cas de SLA est de plus associée à une sévérité et une progression plus importante de la maladie (Spreux-Varoquaux et al. 2002). Après sa libération par les afférences excitatrices, le glutamate est normalement éliminé rapidement de la fente synaptique. Dans les motoneurones, cette élimination est principalement accomplie par les transporteurs glutamatergiques astrocytaires EAAT2 (GLT-1) (Rothstein et al. 1995). Or des altérations dans l'expression de ce transporteur ont été identifiées dans un large pourcentage des formes sporadiques de la maladie (Rothstein 1995) et plus tard dans tous les modèles murins mSOD1 (Howland et al. 2002; Bruijn et al. 1997). Chez les patients SLA, l'altération de l'efficacité de EAAT2 est due à l'expression de variants d'épissage plutôt qu'à une diminution du niveau d'expression (Sasaki et al. 2001; Münch et al. 2002; Ignacio et al. 2005). Dans le modèle rat SOD1-G93A, l'expression de EAAT2 commence à diminuer dès les stades présymptomatiques et est complètement abolie dans les phases terminales de la maladie (Howland et al. 2002). De plus, la surexpression de EAAT2 dans les souris transgéniques

SOD1-G93A diminuerait l'agrégation de la protéine SOD1 et retarderait la dégénérescence des motoneurones, prolongeant ainsi la durée de vie des animaux (Guo et al. 2003; Rothstein et al. 2005). Les interactions entre les protéines EAAT2 et SOD1 ont été étudiées par coexpression dans les oocytes de xénope. Trotti et collaborateurs (1999) ont montré une inactivation du transporteur par la SOD1-G37R en présence de peroxyde d'hydrogène. EAAT2 serait donc une cible de la toxicité de la SOD1 mutée. L'effet bénéfique du Riluzole sur la maladie pourrait se situer à ce niveau, à la fois par stimulation de la recapture du glutamate par les astrocytes (Azbill et al. 2000; Dunlop et al. 2003) et par inhibition des récepteurs glutamatergiques sur le motoneurone (Debono et al. 1993).

Les astrocytes sont également impliqués dans la régulation des récepteurs post-synaptiques au glutamate (Van Damme et al. 2007). La contribution des récepteurs AMPA aux entrées synaptiques glutamatergiques augmente avec la maturation du motoneurone (Vinay et al. 2000). Ces récepteurs sont normalement constitués de sous-unités GluR2 imperméables aux ions Ca^{2+} . Dans les motoneurones SOD1, cependant, les sous-unités GluR2 sont en partie remplacées par les sous-unités GluR3 conférant aux récepteurs une perméabilité au calcium (Tortarolo et al. 2006) et renforçant l'effet excitotoxique du glutamate. De façon similaire, on retrouve sur les motoneurones des patients SLA des récepteurs AMPA perméables au calcium. Cette perméabilité est due à l'expression de sous-unités AMPA mutantes GluR2Q liées à un défaut d'édition de l'ARN messager.

L'ensemble des mécanismes proposés pour tenter d'expliquer la physiologie de la SLA sont résumés par la [Figure 12](#).

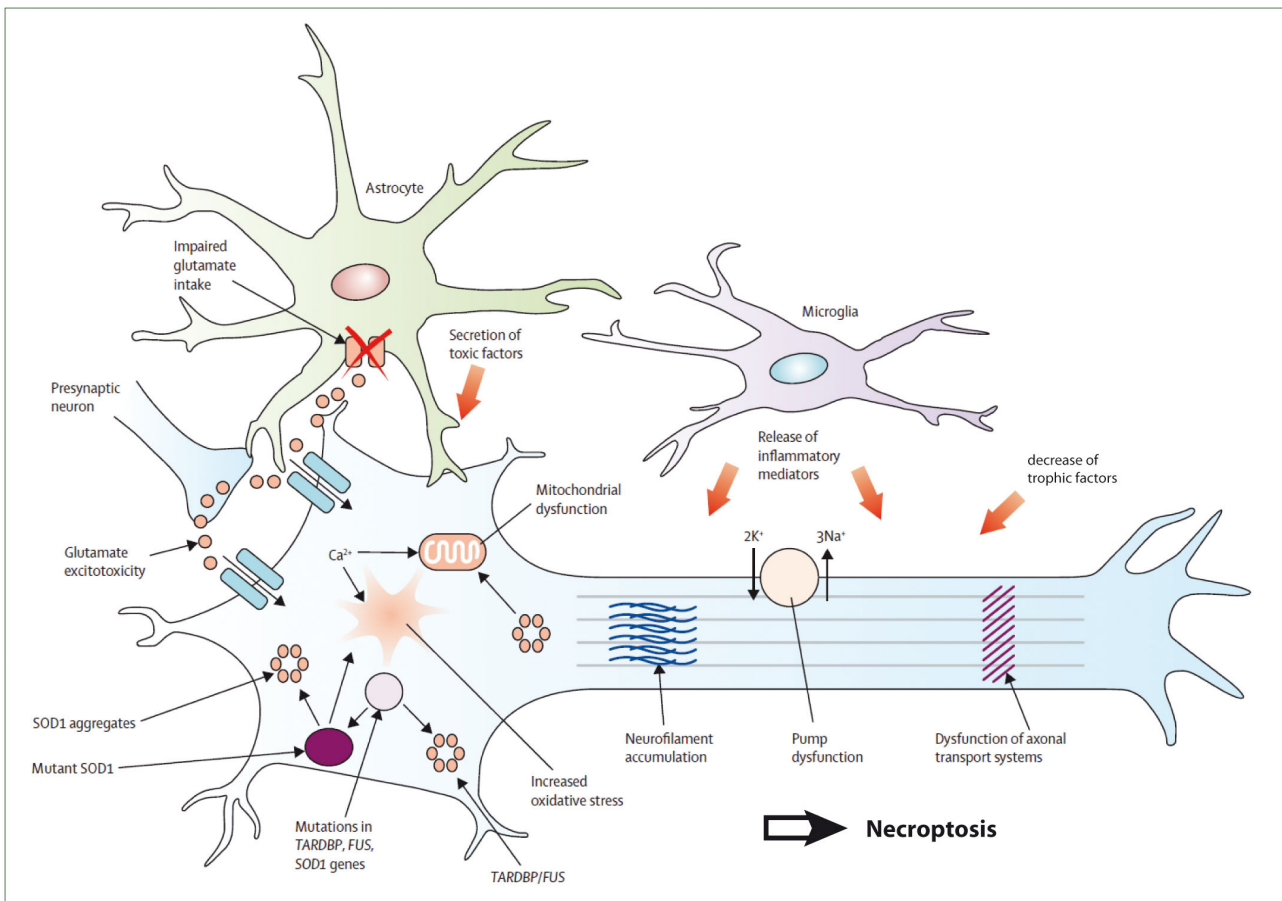


Figure 12 : Mécanismes cellulaires et moléculaires responsables de la neurodégénérescence dans la SLA. Les mécanismes responsables de la dégénérescence des motoneurones dans la SLA sont multifactoriels et pourraient résulter d'interactions complexes entre l'excitotoxicité du glutamate, la génération de radicaux libres, les agrégats cytoplasmiques de protéines, combinés à des dysfonctions mitochondriales et une altération des transports axonaux et dendritiques par accumulation d'agrégats de neurofilaments. Les glies pourraient contribuer à la maladie par la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires et finalement, la dégénérescence pourrait survenir par activation des voies nécroptotiques. Adaptée de Kiernan et al. 2011.

D / Modifications de l'excitabilité intrinsèque des motoneurones dans la SLA

Chez le patient, de études de la conduction nerveuse on pointé une augmentation de l'excitabilité membranaire axonale (Bostock et al. 1995; Tamura et al. 2006; Nakata et al. 2006; Vucic and Kiernan 2006), et le degré d'hyperexcitabilité axonale semble être corrélé négativement à la survie des patients (Kanai et al. 2012). Or, depuis maintenant plusieurs années, des modifications des propriétés intrinsèques et de la morphologie des motoneurones ont été rapportées dans les modèles SOD1. Ces propriétés définissent en grande partie l'excitabilité intrinsèque des motoneurones (cf. Chapitre I) et leur

modification pourrait donc constituer un facteur majeur de la pathologie en interagissant avec les différents mécanismes présentés précédemment. En effet, le calcium n'entre pas seulement dans le motoneurone par les récepteurs glutamatergiques lors de la transmission synaptique, il entre également par les canaux calciques voltage-dépendants à chaque potentiel d'action (Powers & Binder 2001). Une excitabilité intrinsèque accrue des motoneurones (de la même façon que l'excitotoxicité liée au glutamate) pourrait donc potentialiser le stress calcique subi par les neurones en les faisant décharger plus fréquemment. Cette augmentation du calcium intracellulaire mettrait à l'épreuve à la fois le métabolisme énergétique nécessaire à son excrétion via les pompes Na/K (Furukawa et al. 2013) et le bon fonctionnement des mitochondries (Fritz et al. 2013). L'effet bénéfique du Riluzole est un argument en faveur de l'implication de l'hyperexcitabilité dans la maladie. Il permet en effet de prolonger la survie des motoneurones en réduisant leur excitabilité (i.e. réduction des courants entrants persistants et de la libération de glutamate). Toutefois, différentes études sur les modèles SLA relatent des altérations très disparates des propriétés modulant l'excitabilité des motoneurones au cours de la maladie; une hypoexcitabilité n'étant pas à exclure, elle pourrait signifier la mise en place de mécanismes compensatoires visant à limiter l'excitotoxicité du glutamate.

a) Propriétés passives

Certaines équipes font état d'une diminution de la résistance d'entrée des motoneurones de souris SOD1-G93A^{high} (Quinlan et al. 2011) et G85R (Bories et al. 2007; Amendola & Durand 2008) néonatales sans modification de leur potentiel de repos. Cependant, d'autres travaux montrent une stabilité de la résistance d'entrée dans les modèles G93A^{low} et G85R au même âge ainsi qu'une dépolarisation du potentiel de repos des motoneurones G93A^{low} (Pambo-Pambo et al. 2009). Finalement, aucun changement dans les propriétés passives n'a été détecté dans les motoneurones en culture (Pieri et al. 2003; Kuo et al. 2004; Wainger et al. 2014) ou hypoglossaux de souris G93A (van Zundert et al. 2008). La grande variabilité dans ces résultats peut trouver son origine dans la diversité des propriétés toxiques des différentes mutations aussi bien que dans des différences du timing des altérations interagissant avec des mécanismes compensatoires (Pambo-pambo et al. 2009). La vulnérabilité différentielle des motoneurones selon leur type physiologique est également à prendre en compte; les

mécanismes pathologiques pouvant survenir spécifiquement ou avec un timing différent dans les motoneurones les plus vulnérables (Bories et al. 2007, Amendola & Durand 2008).

b) Morphologie

Des études morphologiques ont été entreprises en parallèle dans ces modèles par marquage intracellulaire des motoneurones. Elles tendent à déterminer si les modifications de la résistance d'entrée observées dans la SLA par certaines équipes peuvent être imputées à d'éventuels changements structuraux de l'arborisation dendritique. Martin et al. (2013) ont rapporté une augmentation de résistance d'entrée liée à un raccourcissement des segments dendritiques terminaux des motoneurones spinaux de souris *G93A^{high}* embryonnaires. Les motoneurones *G93A^{high}* hypoglossaux semblent quant à eux montrer une diminution des ramifications dendritiques P6-P9 (van Zundert et al. 2008). Au contraire, Filipchuk et Durand (2012) ont montré un allongement des segments dendritiques terminaux à P3-P4 suivi d'une augmentation de la ramification des dendrites à P7-P8 (Amendola & Durand 2008) dans les motoneurones *G85R*. ElBassiouny et collaborateurs (2010) ont par la suite estimé, au moyen de simulations numériques, dans quelle mesure l'augmentation de la taille des motoneurones mesurée par Amendola et Durand (2008) pouvait expliquer leur diminution de résistance d'entrée. Leurs résultats indiquent que seul un tiers de cette baisse de résistance pouvait être imputée à l'augmentation de la ramification dendritique. Les deux tiers restants étant dus à une diminution de la résistivité membranaire spécifique.

c) Propriétés actives

Comme vu dans le chapitre précédent, les courants entrants persistants modulent la fréquence de décharge des motoneurones. Plusieurs études ont montré une augmentation des courants entrants persistants sodiques et calciques dans les neurones *G93A^{high}* (Kuo et al. 2004; 2005; van Zundert et al. 2008; Pieri et al. 2009; Quinlan et al. 2011), mais une autre étude relate une diminution de ces courants dans les motoneurones

G93A/low et G85R (Pambo-pambo et al. 2009). Le gain de la relation courant-fréquence de ces motoneurones a été décrit comme diminué (Pambo-pambo et al. 2009), augmenté (Kuo et al. 2004) ou inchangé (Bories et al. 2007, Quinlan et al. 2011). De la même façon, les modifications rapportées quant à la forme des potentiels d'actions sont très diverses. Ils sont décrits plus larges (Pambo-pambo et al. 2009, van Zundert et al. 2008) avec une diminution du courant potassique de rectification retardée (Wainger et al. 2014), moins larges (Quinlan et al. 2011) ou inchangés (Bories et al. 2007).

E / Vulnérabilité différentielle

Comme vu précédemment, tous les motoneurones ne sont pas affectés de la même façon par la pathologie. L'analyse des racines ventrales révèle la disparition préférentielle des axones de plus gros calibre (Kong & Xu 1998; Fischer et al. 2004). Dans les modèles SOD1, les motoneurones FF sont les premiers à dénervier leurs fibres musculaires (Frey et al. 2000), suivis des motoneurones FR, alors que les jonctions neuromusculaires des motoneurones S restent en place jusqu'à un stade avancé de la maladie (Pun et al. 2006). Chez les patients SLA sporadiques, les EMGs ont montré que cette dénervation précédait la dégénérescence des motoneurones (Fischer et al. 2004) et que les unités motrices rapides étaient les premières affectées (Dengler et al. 1990). Les données cliniques supportent ainsi le caractère commun de la vulnérabilité différentielle à toutes formes de la SLA (familiales et sporadiques). Toutefois, les causes de cette vulnérabilité différentielle ne sont pas encore claires.

a) Origine neuronale

Les motoneurones FF, les plus vulnérables, sont également les motoneurones ayant les dépenses énergétiques les plus importantes. Ce sont les motoneurones qui établissent le plus grand nombre de jonctions neuromusculaires et qui doivent de fait produire et exporter de grandes quantités de vésicules synaptiques jusqu'aux fibres musculaires. Ils possèdent également les arborisations dendritiques et les volumes intracellulaires les plus importants et nécessitent donc la synthèse de plus grandes quantités de protéines nécessaires au maintien des surfaces membranaires et au trafic

jusqu'aux dendrites distales. Certains auteurs ont ainsi invoqué des difficultés plus importantes pour ces motoneurones à faire face aux différents stress rencontrés dans la pathologie. Des études ont par exemple révélé une plus forte sensibilité au stress du réticulum endoplasmique des motoneurones les plus vulnérables (Saxena et al. 2009; Bernard-Marissal et al. 2012). Les motoneurones FF ont les niveaux de tampons calciques (parvalbumine, calbindine, calmoduline, etc.) les plus bas (Grosskreutz et al. 2010) mais ont tendance à décharger par des bouffées à haute fréquence (Burke 1981) qui génèrent d'importantes charges de calcium dans le motoneurone. Ils sont donc potentiellement plus vulnérables à l'augmentation des influx calciques via les récepteurs AMPA qui sont rencontrés dans la SLA.

b) Origine musculaire

La grande vulnérabilité des unités motrices FF pourrait être directement liée à la quantité importante de fibres musculaires qu'elles innervent (Fahim et al. 1984) et aux propriétés de ces dernières. Les fibres musculaires IIb innervées par les motoneurones FF sont plus faiblement vascularisées que les autres (Burke 1981) et expriment des niveaux plus bas de VEGF (Annex et al. 1998; Lambrechts et al. 2003). Or une étude a révélé une grande sensibilité des jonctions neuromusculaires des unités motrices F au stress ischémique dans le modèle SOD1-G93A (David et al. 2007). Les fibres musculaires IIb produisent également plus de peroxyde d'hydrogène que les autres (Capel et al. 2004). Or la SOD1-G93A peut métaboliser ce peroxyde d'hydrogène en radicaux toxiques hydroxyle (Figure 10; Wiedau-Pazos et al. 1996; Yim et al. 1997; 1999). Finalement, les muscles rapides possèdent des concentrations plus importantes en oxyde nitrique synthase (Grozdanovic 2001) et il a été montré que l'expression de la SOD1-G93A par les motoneurones en culture les sensibilisait à l'oxyde nitrique (Raoul et al. 2002; 2006).

c) Cas des noyaux moteurs résistants

Outre cette différence de vulnérabilité entre les différentes sous-classes de motoneurones, tous les noyaux moteurs ne sont pas affectés de la même façon. Aux stades terminaux de la maladie, alors que la grande majorité des mouvements volontaires

sont perdus, des études cliniques révèlent que les mouvements oculaires et le contrôle volontaire des sphincters rectal et urethral sont préservés (Mitsumoto et al. 2006). Ces fonctions sont contrôlées par les motoneurones des noyaux abducens, trochléaire et oculomoteur dans le tronc cérébral et du noyau d'Onuf dans la moelle épinière lombosacrée. Les analyses post-mortem ont révélé que ces motoneurones étaient presque complètement épargnés dans ces noyaux à un stade où les motoneurones spinaux ont déjà dégénéré (Schrøder & Reske-Nielsen 1984; Gizzi et al. 1992; Mannen 2000; Kaminski et al. 2002). Ces observations ont été reproduites dans les modèles SOD1 pour les noyaux oculomoteur, trochléaire et abducens (Ferrucci et al. 2010) ainsi que dans le noyau d'Onuf (Hamson et al. 2002). La préservation de certains noyaux a donné l'opportunité à plusieurs équipes de déterminer les différences moléculaires et cellulaires de leurs motoneurones avec les motoneurones spinaux et de déterminer leur rôle dans la résistance à la maladie. Ces études ont révélé que les courants calciques médiés par les récepteurs AMPA sont plus faibles et que les courants chlore médiés par les récepteurs GABA sont plus importants dans les motoneurones des noyaux résistants (Brockington et al. 2013), ce qui suggère une susceptibilité réduite de ces motoneurones à l'excitotoxicité. D'autres études ont montré qu'ils possédaient également de plus grandes concentrations en tampons calciques calbindine et parvalbumine (Alexianu et al. 1994; Vanselow & Keller 2000; Obál et al. 2006) qui pourraient leur permettre de gérer plus facilement le stress calcique. Cependant, la surexpression de parvalbumine dans les motoneurones SOD1 spinaux n'a que peu d'effet sur leur survie (Beers et al. 2001).

Chapitre IV - Excitabilité des motoneurones spinaux de souris SOD1-G93A adultes

Introduction

Comme vu précédemment, le maintien d'une excitabilité normale est particulièrement importante pour les motoneurones puisqu'elle va définir la commande motrice. Cette excitabilité est probablement régulée de manière homéostatique afin de permettre aux motoneurones d'assurer leur fonction. Toutefois, une dysfonction de cette homéostasie pourrait survenir au cours de la SLA. Une augmentation de l'excitabilité intrinsèque (diminution de la conductance d'entrée, diminution de la rhéobase, etc.) des motoneurones, évoquée par plusieurs auteurs (cf. Chapitre IV), pourrait contribuer au stress excitotoxique dans la Sclérose Latérale Amyotrophique. Cependant, d'autres études mentionnent une diminution de l'excitabilité des motoneurones au cours de la maladie.

Si une hyperexcitabilité intrinsèque joue effectivement un rôle dans la mort cellulaire des motoneurones au cours de la SLA, elle devrait atteindre son paroxysme à l'âge où les dénervations des jonctions neuromusculaires se produisent. Une étude précédente (Meehan et al. 2010) a mesuré l'excitabilité des motoneurones spinaux de souris adultes du modèle SOD1-G127X. Les auteurs n'ont montré dans ce modèle ni modification de la conductance d'entrée ni de la rhéobase, mais ont observé une diminution du courant de transition entre zone « primaire » et « secondaire » suggérant une augmentation du courant entrant persistant calcique. Toutefois, l'âge auquel surviennent les dénervations dans ce modèle n'est pas connu, il est donc difficile de savoir si ces changements précèdent ou suivent les dénervations. Une autre étude (M. Jiang et al. 2009), chez les souris SOD1-G93A^{high} adultes cette fois-ci, a montré qu'il n'y avait pas de modification d'excitabilité dans la boucle réflexe *la* de la moelle sacro-caudale, mais cette étude ne permet pas la discrimination entre excitabilité intrinsèque et extrinsèque.

Dans cette présente étude, nous avons utilisé le modèle SOD1-G93A*high*, dans lequel l'âge auquel s'opèrent les dénervations est bien connu (Pun et al. 2006, Hegedus et al. 2007,2008), afin de déterminer si une hyperexcitabilité intrinsèque des motoneurones était à l'œuvre lorsqu'ils dénervent leurs jonctions neuromusculaires. Pour ce faire, nous avons mesuré les propriétés d'excitabilité intrinsèques dans les motoneurones de souris adultes, à la fois *in vivo* et *in vitro* et à des âges précédant la dégénérescence des corps cellulaires mais couvrant la première vague de dénervation.

Méthodes

Préparation *in vivo*

Pour les besoins de l'étude, nous avons utilisé des souris sauvages (WT) et SOD1-G93A*high* (SOD1) de fond génétique CD1 (âgées de 34 à 82 jours) obtenues, après plusieurs générations, par croisement entre des souris CD1 sauvages et SOD1-G93A*high* de fond génétique B6SJL (Gurney et al. 1994). La procédure chirurgicale ainsi que les méthodes d'enregistrement étaient les mêmes que celles utilisées dans notre précédent article (Iglesias et al. 2011, cf. Méthodes). Brièvement, la souris était anesthésiée au pentobarbital sodique et mise sous respiration artificielle. Un cathéter était introduit dans la jugulaire pour administrer l'anesthésique de manière régulière, le nerf sciatique était exposé et une laminectomie était effectuée sur les segments vertébraux Th13 et L1. Les motoneurones étaient empalés par une microélectrode au KCL 3M (pointe 1,0-1,5µm, résistance 5-10MΩ). Ils étaient identifiés par enregistrement d'un potentiel d'action antidromique lors de la stimulation du nerf sciatique.

Préparation *in vitro* (réalisée par nos collaborateurs à Chicago)

Pour s'assurer que nos résultats provenant des expériences *in vivo* n'étaient pas biaisés par la présence de l'anesthésie, nous les avons confirmé dans une préparation *in vitro* nous permettant de nous affranchir de l'anesthésie. Les enregistrements intracellulaires *in vitro* ont été réalisés sur une préparation de moelle épinière sacro-caudale isolée de souris sauvages (WT) et SOD1-G93A*high* (SOD1) de fond génétique

B6SJL âgées de 40 à 50 jours. Dans cette préparation, les souris étaient anesthésiées à l'uréthane, leur moelle épinière caudale était extraite à partir du segment vertébral Th12 et transférée dans une chambre d'enregistrement perfusée avec du liquide cérébro-spinal artificiel oxygéné et à température ambiante (Jiang & Heckman 2006; Manuel et al. 2012). Les enregistrements étaient effectués après rinçage des résidus d'anesthésique (contrôlé par la réapparition des courants entrants persistants des motoneurones; Bennett et al. 2001a). Les motoneurones étaient empalés par une microélectrode contenant du KCL 3M ou un mélange KCl 1M / acétate de potassium 1M (résistance 25-30MΩ). Ils étaient identifiés par enregistrement d'un potentiel d'action antidromique lors de la stimulation des racines ventrales.

Electrophysiologie

La conductance d'entrée des motoneurones a été estimée par la pente des courbes courant-voltage (I-V) obtenues lors d'injection de créneaux de courants dépolarisants et hyperpolarisants (Article 2, Figure 1A). En raison du courant I_h exprimé par les motoneurones, les réponses en voltage aux créneaux de courant montre un fléchissement suivi d'un plateau. Nous avons donc effectué nos mesures au pic de la réponse, en début de créneau, où la contribution de I_h est négligeable. Nous avons également mesuré le ratio entre les mesures de conductance au pic et au plateau des réponses afin d'estimer la quantité de courant I_h exprimée par les motoneurones (Manuel et al. 2009).

Nous avons étudié les propriétés de décharge des motoneurones au moyen de rampes triangulaires de courant, de vitesses allant de 0,1 à 10nA/s. Nous avons extrait la fréquence instantanée de décharge des motoneurones en réponse au courant injecté afin d'obtenir leurs courbes courant-fréquence (I-F). Le seuil en voltage a été déterminé sur le premier potentiel d'action des rampes au point où la dérivée du voltage $10\text{mV}\cdot\text{ms}^{-1}$ (Sekerli et al. 2004). Le courant de recrutement des motoneurones a été déterminé par l'intensité de la rampe de courant atteinte à ce point.

Analyse

Nous avons comparé les propriétés électriques de 51 motoneurones SOD1 (provenant de 19 souris) et 49 WT (23 souris) enregistrés dans la préparation *in vivo* ainsi que 34 motoneurones SOD1 (18 souris) et 41 WT (23 souris) dans la préparation *in vitro*. Tous ces motoneurones avaient un potentiel de repos inférieur à -50mV et un potentiel dépassant 0mV au pic des potentiels d'action. Les distributions des paramètres enregistrés ne suivant pas une distribution normale (test de Kolmogorov-Smirnov), nous avons utilisé le test non paramétrique de Wilcoxon-Mann-Whitney (WMW) pour comparer les moyennes (avec un seuil de significativité fixé à 0,05). Puisque la maladie progresse pendant la période de temps explorée dans notre étude, nous avons comparé les effets de la mutation par rapport à ceux de l'âge par une ANCOVA non paramétrique.

Résultats

La conductance d'entrée des motoneurones des souris SOD1 adultes est augmentée

Nous avons commencé par comparer les conductances d'entrée des motoneurones SOD1 et WT enregistrés *in vivo*. Les conductances SOD1 [$0,50 \pm 0,18 \mu\text{S}$ (0,22-0,93 μS) $n=47$] augmentaient en moyenne de 35% par rapport aux conductances WT [$0,37 \pm 0,16 \mu\text{S}$ (0,10-0,77 μS) $n=49$ WMW $p<0,001$]. Pour les deux génotypes, la conductance d'entrée augmentait avec l'âge des souris ([Article 2, Figure 1B](#)), mais l'ANCOVA a révélé que bien que la pente de cette relation soit la même (test de parallélisme $p=0.64$), la différence des moyennes était due à un décalage de la gamme de conductances SOD1 vers de plus hautes valeurs ([Article 2, Figure 1C](#); $p=0,003$). Nous n'avons notamment pas mesuré de conductance d'entrée SOD1 plus basse que 0,2 μS alors que ces valeurs étaient communes pour les motoneurones WT. Les motoneurones SOD1 affichaient par contre des valeurs de conductance plus élevée que 0,8 μS , jamais observées dans les motoneurones WT.

La mutation induisait aussi une augmentation de la conductance au plateau dans les motoneurones SOD1 [$0,70 \pm 0,31 \mu\text{S}$ (0,25-1,61 μS) $n=47$] comparés au WT [$0,61 \pm 0,28 \mu\text{S}$ (0,12-1,25 μS) $n=49$ WMW $p=0,001$]. Ici encore, cette augmentation n'était

pas liée aux âges des souris (test de parallélisme $p=0.26$; ANCOVA $p=0,006$). Cependant le ratio des conductances au pic et au plateau n'était pas différent entre SOD1 [$1,38 \pm 0,23$ $n=47$] et WT [$1,32 \pm 0,26$ $n=49$ ANCOVA $p=0,12$], suggérant une augmentation du courant I_h en parallèle de celle de la conductance d'entrée dans les motoneurones SOD1.

L'augmentation de la conductance d'entrée dans les souris SOD1 ne peut pas être expliquée par la mort cellulaire des plus petits motoneurones puisque c'est toute la gamme des conductances qui est décalée vers les hautes valeurs, avec émergence de hautes valeurs inexistantes pour les motoneurones WT. De plus, aux âges de ces enregistrements, les motoneurones ne sont pas encore censés avoir commencé à dégénérer (Gurney et al. 1994, Chiu et al. 1995).

Malgré la diminution de conductance d'entrée, l'excitabilité reste inchangée dans la plupart des motoneurones SOD1

L'excitabilité d'un neurone est déterminée par la quantité de courant nécessaire pour atteindre le seuil des potentiels d'action, et une fois la décharge engagée, par la pente de la relation I - F . Nous avons étudié ces propriétés de décharge en réponse à l'injection de rampes lentes de courant. Lors de ces rampes, la décharge des motoneurones SOD1 ($n=20$) et WT ($n=31$) montraient une zone « sous-primaire » de décharge durant laquelle les potentiels d'action sont entrecoupés d'oscillations sous-seuil (Iglesias et al. 2011; [Article 2, Figure 2](#)). Ce régime de décharge était suivi d'une zone « primaire » classique, sans oscillations, puis ces dernières réapparaissaient en fin de décharge sur la branche descendante de la rampe. La décharge sur ces rampes était asymétrique et présentait une hystérésis dans le sens horaire (i.e. courant de recrutement supérieur au courant de dé-recrutement; [Article 2, Figure 2A](#)) pour la majorité des motoneurones (85% des SOD1 et 71% des WT). Les autres motoneurones présentaient une hystérésis dans le sens anti-horaire (i.e. courant de recrutement inférieur au courant de dé-recrutement; [Article 2, Figure 2B](#)). Aucune différence entre les proportions d'hystérésis horaires et antihoraires n'a été retrouvée entre les populations SOD1 et WT (Test exact de Fisher $p=0,32$).

De manière étonnante, le courant de recrutement n'était pas différent entre les échantillons SOD1 [$6,0 \pm 3,0$ nA (2,1-11,4 nA) $n=29$] et WT [$5,0 \pm 3,5$ nA (1,2-12,6 nA) $n=37$ WMW $p=0,11$] ([Article 2, Figure 3B](#)). Il était cependant hautement corrélé aux valeurs de conductance d'entrée dans les motoneurones SOD1 [coéf. de corrélation de Pearson $r=0,85$ $p<0,0001$] et WT [$r=0,64$ $p<0,0001$], mais les régressions n'étaient pas différentes ([Article 2, Figure 3A](#); ANCOVA $p=0,68$). De plus, le gain de la courbe I-F mesuré en zone primaire n'était pas différent non plus entre les populations de motoneurones SOD1 [$16,2 \pm 6,7$ Hz/nA (9-32 nA) $n=12$] et WT [$18,0 \pm 9,7$ Hz/nA (7-40 nA) $n=23$ WMW $p=0,85$] ([Article 2, Figure 4A](#)).

L'absence de changement de courant de recrutement n'était due ni à une hyperpolarisation du seuil de décharge [SOD1 : -49 ± 8 mV (-64 à -30 mV) $n=18$; WT : -51 ± 8 mV (-64 à -28 mV) $n=35$ WMW $p=0,3$] ([Article 2, Figure 4B](#)), ni à une dépolarisation du potentiel de repos [SOD1 : -63 ± 9 mV (-83 à -50 mV) $n=51$; WT : -66 ± 9 mV (-81 à -50 mV) $n=49$ WMW $p=0,15$]. L'absence de changement du potentiel de repos malgré l'augmentation du courant I_h suggère que les courants de fuite sont également augmentés dans les motoneurones SOD1 puisqu'ils ont un effet opposé sur le potentiel de repos.

Le maintien du courant de recrutement malgré l'augmentation de conductance pourrait être expliqué par une augmentation des courants dépolarisants sous-seuil dans les motoneurones SOD1. A l'appui de cette hypothèse, nous avons souvent observé une accélération de la trajectoire du voltage pendant les rampes avant les premiers potentiels d'action. En conséquence, le courant de recrutement mesuré était plus petit que celui espéré si la membrane se comportait de façon passive avant les premiers potentiels d'action. Or la différence entre le courant mesuré et celui espéré (estimé par extrapolation de la trajectoire linéaire du voltage) était plus importante dans les motoneurones SOD1 ($1,9 \pm 1,6$ nA $n=14$) que WT ($0,7 \pm 1,0$ nA $n=33$ WMW $p=0,002$), suggérant ainsi qu'un courant dépolarisant sous-seuil (probablement sodique persistant; Harvey et al. 2006, Kuo et al. 2006) est augmenté dans les motoneurones SOD1 ([Article 2, Figure 3C](#)). Ce mécanisme pourrait constituer une forme de régulation homéostatique de l'excitabilité des motoneurones. Une telle augmentation du courant sodique persistant a déjà été rapporté dans les motoneurones de souris SOD1 néonatales et pourrait donc persister à l'âge adulte.

Une fraction des motoneurones SOD1 devient hypoexcitable

Malgré le maintien de l'excitabilité dans la plupart des motoneurones SOD1, une fraction d'entre eux n'était pas capable de soutenir une décharge répétée sur les rampes de courant ([Article 2, Figure 5](#)). Certains motoneurones n'étaient capables de produire que quelques potentiels d'action ([Article 2, Figure 5A](#)) alors que les autres restaient totalement silencieux ([Article 2, Figure 5B](#)) malgré le fait qu'ils soient toujours capables d'émettre un potentiel d'action unique en réponse à une brève stimulation. Cette perte d'habileté à décharger de manière répétée survenait avant la dénervation des jonctions neuromusculaires. Lors de la stimulation intracellulaire de ces motoneurones, nous avons en effet pu enregistrer un signal électromyographique dans le muscle innervé ([Article 2, Figure 5A](#)).

Parmi les 38 motoneurones SOD1 soumis aux rampes de courant, seuls 22 (58%) étaient capables de produire une décharge soutenue. 4 (10%) n'émettaient que quelques potentiels d'action et 12 (32%) restaient totalement silencieux ([Article 2, Figure 6A](#)). De manière intéressante, les 16 motoneurones hypoexcitables avaient des conductances d'entrée réparties sur la totalité de la gamme de valeur. Parmi les 41 motoneurones WT testés, 36 (88%) produisaient une décharge répétée, 2 (5%) n'émettaient que quelques potentiels d'action et seulement 3 (7%) restaient silencieux ([Article 2, Figure 6A](#)). Les 5 motoneurones ne montrant pas une décharge complète avaient cette fois ci des conductances d'entrée restreintes aux plus hautes valeurs ($>0,42\mu\text{S}$). La proportion de motoneurones SOD1 échouant à produire une décharge complète (42%) étaient significativement plus importante que celle des motoneurones WT (12% test exact de Fisher $p=0,004$).

Le contraste entre les motoneurones de souris SOD1 et WT était frappant entre 34 et 60 jours ([Article 2, Figure 6B](#)), période au terme de laquelle les toutes premières dénervations des jonctions neuromusculaires se produisent (Pun et al 2006, Hegedus et al. 2007, 2008). Au cours de cette période, seuls 11 des 17 motoneurones SOD1 (65%) produisaient une décharge répétitive sur rampe. Les 6 autres (35%) ne déchargeaient pas du tout sur les rampes. A l'inverse, les 21 motoneurones WT (100%) produisaient tous une

décharge répétitive sur rampe (test exact de Fisher $p=0,004$). Ici encore, les 6 motoneurones SOD1 hypoexcitables avaient des conductances d'entrée réparties sur toute la gamme de valeurs.

Ces résultats indiquent que dans les souris SOD1, une large fraction des motoneurones devient moins excitable à l'âge adulte et que cette hypoexcitabilité touche uniformément les motoneurones quelle que soit leur conductance d'entrée. Il est donc possible que même les motoneurones S, ayant les plus petites conductances, soient aussi affectés précocement.

Mécanismes de génération des potentiels d'action dans les motoneurones hypoexcitables

Dans le développement normal, une augmentation du courant sodique persistant vient compenser l'augmentation de la conductance d'entrée liée à l'âge. Un déficit de ce courant entrant persistant empêche les motoneurones de soutenir une décharge répétée en réponse à de longs créneaux de courant ou à des rampes lentes de courant (Kuo et al. 2006, Miles et al. 2005, Lee & Heckman 2001). Si l'incapacité à décharger de nos motoneurones hypoexcitables est due à une incapacité du courant sodique persistant à compenser l'augmentation de conductance liée à la croissance, les motoneurones hypoexcitables devraient arborer deux comportements : l'accélération de la dépolarisation (due à l'activation du courant sodique persistant) précédant les premiers potentiels d'action sur rampe devrait être diminuée mais ces cellules devraient toujours être capables d'émettre un potentiel d'action en réponse à une brève stimulation (l'injection instantanée d'une grande quantité de courant permettant au potentiel d'action d'être émis sans contribution du courant sodique persistant).

Ces prédictions se vérifient dans nos motoneurones hypoexcitables puisqu'ils étaient tous capables de décharger en réponse à de brèves stimulations. De plus, l'accélération de la dépolarisation était absente avant la décharge des motoneurones n'émettant que quelques potentiels d'action sur les rampes ([Article 2, Figure 7](#)). Ces résultats suggèrent donc fortement que la diminution du courant sodique persistant est un mécanisme majeur dans le développement de l'hypoexcitabilité de ces motoneurones.

L'absence d'hyperexcitabilité n'est pas liée à l'anesthésie

Les résultats précédents ont été obtenus sous anesthésie, or il a été montré que les barbituriques que nous avons utilisés pouvaient supprimer des courants voltage-dépendants ayant un impact important sur l'excitabilité des motoneurones (Guertin & Hounsgaard 1999). Pour cette raison, il était important de vérifier ces résultats en l'absence d'anesthésie. Pour des raisons techniques, l'enregistrement de motoneurones lombaire dans une préparation *in vivo* décérébrée ou *in vitro* n'était pas possible, nous avons donc utilisé une préparation de moelle épinière sacro-caudale *in vitro* (Jiang & Heckman 2006, Manuel et al. 2012). Les motoneurones présent dans la moelle épinière sacro-caudale innervent les muscles de la queue et dégénèrent aux mêmes âges que les motoneurones lombaires dans les modèles SOD1 (Alves et al. 2011).

Les motoneurones sacro-caudaux ont été enregistrés entre P40 et P50, juste avant la dénervation de leurs jonctions neuromusculaires. Ils avaient une conductance d'entrée plus petite que celle des motoneurones lombaires. Néanmoins leur conductance d'entrée était plus élevée de 46% en moyenne [$0,19 \pm 0,08 \mu\text{S}$ ($0,09-0,38 \mu\text{S}$) $n=33$] dans les souris mSOD1 que dans les souris WT [$0,13 \pm 0,07 \mu\text{S}$ ($0,05-0,35 \mu\text{S}$) $n=41$ WMW $p<0,001$] ([Article 2, Figure 8A](#)). L'excitabilité de ces neurones a été explorée sur des rampes de courant. Comme les motoneurones lombaires, ils exprimaient des hystérésis horaires ([Article 2, Figure 8B](#)) et anti-horaires. Le courant de recrutement et le gain de leurs courbes I-F n'étaient pas différents entre les motoneurones SOD1 et WT, suggérant un maintien de l'excitabilité dans la plupart des motoneurones SOD1. De nouveau, le maintien du courant de recrutement ne pouvait s'expliquer ni par une hyperpolarisation du seuil des potentiels d'action ni par une dépolarisation du potentiel de repos.

Comme dans la moelle lombaire, une fraction plus importante de motoneurones sacro-caudaux SOD1 que de motoneurones WT n'était plus capable de soutenir une décharge répétitive sur les rampes de courant (SOD1 : 8/27 30%; WT : 4/32 12%; [Article 2, Figure 8C, D](#)). De plus les conductances de des motoneurones SOD1 hypoexcitables étaient réparties sur toute la gamme de valeurs alors que celles des motoneurones WT étaient restreintes aux plus hautes valeurs.

Conclusions

Nous avons donc montré que les motoneurones lombaires et sacro-caudaux des souris SOD1-G93A^{high} adultes n'étaient pas hyperexcitables. Au contraire, la majorité d'entre eux parvenaient à maintenir leur excitabilité à un niveau normal malgré l'augmentation de leur conductance d'entrée. Leur potentiel de repos, leur seuil de décharge, leur courant de recrutement ainsi que leur gain I-F en zone primaire restaient inchangés. Cette homéostasie de l'excitabilité échouait toutefois dans une fraction des motoneurones qui perdaient leur habilité à décharger de manière répétée en réponse à un courant quasi-stationnaire (rampes lentes) et devenaient de fait hypoexcitables. L'absence d'hyperexcitabilité n'était due ni à l'utilisation de l'anesthésique *in vivo*, puisque des résultats similaires ont été retrouvés dans la préparation *in vitro*, ni à la dégénérescence des motoneurones les plus excitables, nos expériences étant réalisées à un âge plus précoce que celui où la dégénérescence des corps cellulaires survient. L'augmentation de conductance d'entrée n'était pas, quant à elle, due à la perte des motoneurones les plus petits qui sont les moins vulnérables à la SLA.

Article 2

Adult Spinal Motoneurons are not Hyperexcitable in a Mouse Model of Inherited Amyotrophic Lateral Sclerosis

Adult spinal motoneurons are not hyperexcitable in a mouse model of inherited amyotrophic lateral sclerosis

Nicolas Delestrée¹, Marin Manuel^{1,2}, Caroline Iglesias¹, Sherif M. Elbasiouny², C. J. Heckman^{2,3,4} and Daniel Zytnicki¹

¹Laboratoire de Neurophysique et Physiologie, UMR CNRS 8119, Université Paris Descartes, Paris 75006, France

Departments of ²Physiology, ³Physical Medicine and Rehabilitation & ⁴Physical Therapy and Human Movement Science, Northwestern Feinberg School of Medicine, Chicago, IL 60611, USA

Key points

- Intrinsic hyperexcitability of spinal motoneurons is thought to contribute to excitotoxicity during amyotrophic lateral sclerosis (ALS), but it has never been demonstrated that adult motoneurons become hyperexcitable before disconnection from their muscle fibres.
- We found an increased input conductance in motoneurons recorded in a mouse model of ALS. Yet, most cells retained normal excitability as measured by current onset for firing and input–output gain. This indicates successful regulation of excitability, compensating for the increase in conductance.
- In contrast, some cells became hypoexcitable, losing their ability to fire repetitively to quasi-stationary inputs before denervation. Hypoexcitability might therefore be an early marker of disease progression.
- We thereby demonstrate that, if excitotoxicity is indeed a mechanism leading to degeneration in ALS, it is not caused by changes in the intrinsic electrical properties of the motoneurons but most probably by extrinsic factors such as excessive synaptic excitation.

Abstract In amyotrophic lateral sclerosis (ALS), an adult onset disease in which there is progressive degeneration of motoneurons, it has been suggested that an intrinsic hyperexcitability of motoneurons (i.e. an increase in their firing rates), contributes to excitotoxicity and to disease onset. Here we show that there is no such intrinsic hyperexcitability in spinal motoneurons. Our studies were carried out in an adult mouse model of ALS with a mutated form of superoxide dismutase 1 around the time of the first muscle fibre denervations. We showed that the recruitment current, the voltage threshold for spiking and the frequency–intensity gain in the primary range are all unchanged in most spinal motoneurons, despite an increased input conductance. On its own, increased input conductance would decrease excitability, but the homeostasis for excitability is maintained due to an upregulation of a depolarizing current that is activated just below the spiking threshold. However, this homeostasis failed in a substantial fraction of motoneurons, which became hypoexcitable and unable to produce sustained firing in response to ramps of current. We found similar results both in lumbar motoneurons recorded in anaesthetized mice, and in sacrocaudal motoneurons recorded *in vitro*, indicating that the lack of hyperexcitability is not caused by anaesthetics. Our results suggest that, if excitotoxicity is indeed a mechanism leading to degeneration in ALS, it is not caused by the intrinsic electrical properties of motoneurons but by extrinsic factors such as excessive synaptic excitation.

N. Delestrée and M. Manuel contributed equally to this work.

(Received 30 September 2013; accepted after revision 19 January 2014; first published online 20 January 2014)

Corresponding author M. Manuel: Laboratoire de Neurophysique et Physiologie, UMR CNRS 8119, Université Paris Descartes, 45 rue des Saints-Pères, 75006 Paris, France. Email: marin.manuel@neurobio.org

Abbreviations ALS, amyotrophic lateral sclerosis; SOD1, superoxide dismutase 1; WT, wild-type; ACSF, artificial cerebrospinal fluid; ANCOVA, analysis of covariance; TTX, tetrodotoxin; AMPA, 2-amino-3-(3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-yl)propanoic acid; S, slow contracting; FR, fast contracting, fatigue resistant; FF, fast contracting, fatigable

Introduction

The intrinsic excitability of a neurone is a primary determinant of its normal function and is probably homeostatically regulated. Preservation of normal excitability is particularly important for spinal motoneurons, which generate the output of all motor commands. A dysfunction of homeostatic control of motoneurone excitability might occur in amyotrophic lateral sclerosis (ALS), in which there is a progressive degeneration of these cells.

ALS is an adult onset neurodegenerative disease leading to the death of both corticospinal motor neurones and spinal motoneurons. Despite the fact that mutations on several genes have been identified in familial forms of the disease, including the superoxide dismutase 1 (SOD1) G93A gene mutation (Rosen *et al.* 1993), the pathophysiology of ALS remains poorly understood. Many mechanisms have been proposed (reviewed in Ilieva *et al.* 2009), among them oxidative damage, protein aggregation, axonal transport deficits and astrocyte-mediated cell damage. Glutamate-mediated excitotoxicity has been proposed very early on as a potential mechanism for the degeneration of motoneurons in ALS (Rothstein *et al.* 1990). According to this hypothesis, an elevation of intracellular calcium by repetitive firing or by calcium-permeable glutamate receptors is harmful and would trigger their apoptotic death. Calcium-related apoptotic death is particularly probable in motoneurons, given their restricted calcium buffering capabilities (von Lewinski & Keller, 2005). As part of the excitotoxicity hypothesis, it was suggested that intrinsic hyperexcitability of motoneurons could, by itself, contribute to excitotoxic stress (Kuo *et al.* 2005; von Lewinski & Keller, 2009; Ilieva *et al.* 2009). A chronically hyperexcitable motoneurone would fire more spikes in response to a given synaptic input and consequently more calcium ions would flow into the cytoplasm, eventually leading to its death.

Using mouse models incorporating the mutant human SOD1 gene (mSOD1), several studies have set out to test the intrinsic excitability of the motoneurons during ALS. Very young motoneurons from mSOD1 embryos recorded in whole spinal cords *in vitro* (Martin *et al.* 2013) or in culture (Pieri *et al.* 2003; Kuo *et al.* 2005) are clearly hyperexcitable due to increased sodium currents. Neonatal motoneurons display a strong upregulation of both voltage-sensitive sodium and calcium currents (Quinlan

et al. 2011). Yet unlike motoneurons from embryos, the input conductance of neonatal motoneurons is substantially increased in mSOD1 mice (Bories *et al.* 2007; Quinlan *et al.* 2011). This conductance increase compensated for the increased voltage-dependent currents and thereby kept overall excitability of neonatal mSOD1 motoneurons at the same level as controls (Quinlan *et al.* 2011).

Nevertheless, if intrinsic hyperexcitability is a significant contributor to cell death in ALS, it should become manifest at later developmental stages and it should reach its maximum at the age where neuromuscular junctions start to degenerate. It is thus particularly important to establish whether spinal motoneurons are hyperexcitable just before the degeneration of neuromuscular junctions. A previous study by Meehan *et al.* (2010) has assessed adult motoneurone excitability in a different SOD1 model (G127X). The authors have shown that, in this model, there were no changes in input conductance or rheobase, but the transition from primary range to secondary range occurred at a lower firing frequency, suggesting an increase in calcium persistent current. However, the time of denervation is unknown in this model and it is therefore difficult to assess if these changes precede or follow the denervation. Jiang *et al.* (2009) have shown that there were no changes in the monosynaptic reflex loop in the sacrocaudal cord of adult G93A mice, but this study does not allow separation of intrinsic and extrinsic excitability. In the present study, we have used SOD1 G93A mice, in which the times of denervations are well known (Pun *et al.* 2006; Hegedus *et al.* 2007, 2008), and we have investigated the intrinsic electrical properties of adult mouse motoneurons both *in vivo* and *in vitro* (Jiang & Heckman, 2006; Manuel *et al.* 2009). We studied the age range of 30–80 days, spanning the time when the first waves of denervation occur without appreciable motoneurone loss in the spinal cord (Gurney *et al.* 1994; Chiu *et al.* 1995). Our results show that, in both preparations, excitability was preserved in the majority of cases despite an increase in cell input conductance. In a substantial number of motoneurons, however, hypoexcitability developed as they failed to produce sustained firing in response to quasi-stationary inputs. Altogether, motoneurons do not develop hyperexcitability at stages of the disease just preceding the denervation of neuromuscular junctions. Instead, homeostatic processes maintain excitability in

most cells and, in a substantial subpopulation, homeostasis fails and is replaced by hypoexcitability. These results show that, if excitotoxicity is indeed a fundamental cause of degeneration, it is not caused by an intrinsic hyperexcitability of the motoneurons but must instead be due to alterations in their synaptic inputs.

Methods

In vivo experiments

In vivo experiments were performed in accordance with European directives (86/609/CEE and 2010-63-UE) and French legislation. They were approved by the Paris Descartes University ethics committee.

Because of the invasive nature of the *in vivo* experiments, we chose to backcross the SOD1^{G93A} transgene on a CD1 strain, which is easier to breed and was thought to have a lower mortality to our surgical procedures. B6.Cg-Tg(SOD1*G93A)1Gur/J males (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) were crossed with CD1 females (Charles River, L'Arbresle, France) and the transgene copy number was measured by quantitative polymerase chain reaction and was found to be >20. The CD1-Tg(SOD1*G93A) mice had a phenotype very similar to the mSOD1 mice on B6 and B6SJL backgrounds. They developed a progressive paralysis starting with the hindlimbs at about postnatal day (P)90, and reached their endstage point at about P120. Motoneurons from mSOD1 mice were compared to a population of wild-type (WT) motoneurons, recorded from their non-transgenic littermates, as well as the CD1 mice used in Manuel *et al.* (2009).

The surgical procedures have been described previously (Manuel *et al.* 2009; Iglesias *et al.* 2011; Manuel & Heckman, 2012a). Briefly, atropine (0.20 mg kg⁻¹; Aguettant, Lyon, France) and methylprednisolone (0.05 mg; Solu-Medrol; Pfizer, Paris, France) were given subcutaneously at the onset of experiment, to prevent salivation and oedema, respectively. Fifteen minutes later, the anaesthesia was induced with an intraperitoneal injection of sodium pentobarbitone (70 mg kg⁻¹; pentobarbital; Ceva Santé Animale, Libourne, France). A tracheotomy was performed, and the mouse was artificially ventilated with pure oxygen (SAR-830/AP ventilator; CWE, Ardmore, PA). The end tidal P_{CO_2} was maintained at about 4% (MicroCapstar; CWE). The heart rate was monitored (CT-1000; CWE), and the central temperature was kept at 37°C using an infrared heating lamp and electric blanket. A catheter was introduced in the external jugular vein, allowing us to supplement the anaesthesia whenever necessary (usually every 10–20 min) by intravenous injections (6 mg kg⁻¹). The adequacy of anaesthesia was assessed on lack of noxious reflexes and on the stability of the heart rate (usually 400–500 bpm) and end-tidal P_{CO_2} . A slow intravenous infusion (50 $\mu\text{l h}^{-1}$)

of a 4% glucose solution containing NaHCO₃ (1%) and gelatine (14%; Plasmion; Fresenius Kabi, Sèvres, France) helped maintain the physiological parameters. In some experiments, the animal was paralysed after the surgery with pancuronium bromide (Pavulon; Schering-Plough, Courbevoie, France). In this case, additional doses of anaesthetics were provided at the same frequency as before the paralysis, and adequacy of the anaesthesia was assessed on the stability of the heart rate and of the P_{CO_2} . In all experiments, the sciatic nerve was dissected and mounted on a monopolar electrode for stimulation. The vertebral column was immobilized with two pairs of horizontal bars (Cunningham Spinal Adaptor; Stoelting, Dublin, Ireland) applied on the Th12 and L2 vertebral bodies, and the L3–L4 spinal segments were exposed by a laminectomy at the Th13–L1 level. The tissues in the hindlimb and the spinal cord were covered with pools of mineral oil. At the end of the experiments, animals were killed with a lethal intravenous injection of pentobarbitone.

The motoneurons were impaled with micropipettes (tip diameter, 1.0–1.5 μm) filled with 3 M KCl (resistance, 5–10 M Ω). Recordings were made using an Axoclamp 2B amplifier (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) connected to a Power1401 interface and using the Spike2 software (CED, Cambridge, England). After impalement, identification of motoneurons rested on the observation of antidromic action potentials in response to the electrical stimulation of their axon in the sciatic nerve. All motoneurons retained for analysis had a resting membrane potential below –50 mV and an overshooting action potential >65 mV. All recordings were performed using the discontinuous current clamp mode (7–9 kHz) and sampled at 20 kHz.

In vitro experiments

Intracellular recordings were made from motoneurons in the sacrocaudal spinal cord of adult B6SJL-Tg(SOD1*G93A)1Gur/J mice and their non-transgenic littermates (age 40–50 days old). All experimental procedures were approved by Northwestern University animal research committee.

Procedures have been described previously (Jiang & Heckman, 2006; Manuel *et al.* 2012). Briefly, animals were anaesthetized with urethane (1.8 g kg⁻¹) to dissect out the spinal cord caudal to the T12 vertebra. The sacrocaudal spinal cord was then transferred to a dissection dish containing oxygenated modified artificial cerebrospinal fluid (mACSF) at room temperature (20–21°C). Following a 1 h resting period in mACSF, the cord was transferred to a recording chamber, where it was submerged in normal ACSF flowing at 3–6 ml min⁻¹ at room temperature. The cord was secured by passing insect pins through lateral vasculature and connective tissue and into a silicone elastomer (Sylgard) base. The normal ACSF had the

following composition (in mM): 122 NaCl, 24 NaHCO₃, 3 KCl, 2.5 CaCl₂, 1 MgSO₄ and 12 glucose in distilled water, bubbled with 95% O₂–5% CO₂ and pH 7.4. A modified ACSF (mACSF) was used during dissection and recovery to prevent excitotoxic injury. The mACSF composition was (in mM): 118 NaCl, 24 NaHCO₃, 3 KCl, 1.5 CaCl₂, 1.3 MgSO₄, 25 glucose, 1.4 NaH₂PO₄, 5 MgCl₂ and 1 kynurenic acid.

Intracellular recordings were obtained using sharp electrodes filled with either 3 M KCl or a mixture of 1 M potassium acetate and 1 M KCl and bevelled to a resistance of 25–30 MΩ using a rotary beveller (BV-10; Sutter Instruments, Novato, CA). A stepper-motor (Model 2660 Micropositioner; David Kopf Instruments, Tujunga, CA) was used to advance the electrodes into the ventral horn, and intracellular recordings from motoneurons were made with an Axoclamp 2B intracellular amplifier (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) running in bridge mode or in discontinuous current clamp mode (switching rate 5–8 kHz, output bandwidth 10 kHz) and sampled at 20 kHz with a Spike2/1401Plus system (CED). The ventral roots were wrapped around Ag/AgCl stimulating electrodes and sealed with grease, which allowed for antidromic identification of motoneurons. Motoneurons with a resting potential below –55 mV and antidromic spike overshoot >0 mV were retained for analysis. Neurons were recorded at least 2 h after the injection of urethane, and after the spinal cord was immersed for more than 1 h in ACSF, giving ample time to wash out any residual anaesthetics from the spinal cord, as shown by the fact that persistent inward currents can be readily recorded in the same conditions in rat sacrocaudal spinal cord (Bennett *et al.* 2001).

Electrophysiology

Upon penetration, a series of small amplitude, square current pulses were used to plot the I–V relationship. Motoneurons of mSOD1 mice, as those of WT mice (Manuel *et al.* 2009), exhibited a voltage sag, leading to a plateau, in response to small (depolarizing or hyperpolarizing) current pulses and a rebound (either hyperpolarizing or depolarizing) after the cessation of the pulse (Fig. 1A). These features suggest the presence of an I_h current (McLarnon, 1995). As a consequence, the input conductance was measured from the peak responses (arrowhead in Fig. 1Aa), where the contribution of the I_h current was negligible. The ‘sag ratio’ of the voltage response was then computed as the ratio of the peak resistance over the plateau resistance (Manuel *et al.* 2009).

The discharge properties were investigated using triangular ramps of current (rate 0.1–10 nA s^{–1}). F – I curves were obtained by plotting the instantaneous firing frequency *versus* the intensity of the injected current at the time of the spike. In few cases, long-lasting (500 ms)

depolarizing current pulses, repeated at the frequency of 1 Hz, were also used to study the stationary discharge properties.

The voltage threshold for firing was determined on the first spike of a current ramp, as the point at which the first derivative of the voltage reached 10 mV ms^{–1} (Sekerli *et al.* 2004). The onset current was determined as the intensity of the current ramp at this time point.

Data analysis

We have compared the electrical properties of 51 mSOD1 (from 19 animals) and 49 WT motoneurons (from 23 animals) recorded in the lumbar cord *in vivo* and 34 mSOD1 (from 18 animals) and 41 WT (from 23 animals) in the sacrocaudal cord *in vitro*. Most of the electrical properties described in the Results section did not have a normal distribution (Kolmogorov–Smirnov test), and we therefore used the non-parametric Wilcoxon–Mann–Whitney test to compare averages. $P < 0.05$ was considered as significant.

Because the disease progresses over the time period used in our *in vivo* study (WT: 34–76 days old, 55 ± 13 days old, $n = 49$ vs. mSOD1: 38–82 days old, 59 ± 13 days old, $n = 51$; distributions not significantly different, Kolmogorov–Smirnov $P = 0.24$), we tested the effect of age vs. mutation using a non-parametric, non-linear ANCOVA (Young & Bowman, 1995). This was performed in R v.2.11.1 (R Development Core Team, 2010) using the *sm* package v.2.2–4.1 (Bowman & Azzalini, 2010). Other statistical tests were performed either in Kaleidagraph v4.1 (Synergy Software, Reading, PA) or in R.

The motoneurons recorded *in vitro* were taken from a more restricted time range that was comparable in both genotypes (WT: 41–51 days old vs. mSOD1: 40–50 days old).

Results

Lumbar motoneurons display an increase of their input conductance

We first compared the input conductance (Fig. 1A) of mSOD1 and WT lumbar motoneurons recorded intracellularly in anaesthetized mice from 34 to 82 days old. The input conductances of mSOD1 and WT motoneurons are plotted against mouse age in Fig. 1B. ANCOVA analysis revealed that the mSOD1 mutation elicited an upward shift in the peak input conductance ($P = 0.003$) as shown in Fig. 1C. The mutation had the same impact on conductance regardless of the age of the animals (no significant interaction between age and mutation factors; $P = 0.64$, ANCOVA test for parallelism). Accordingly, the whole distribution of input conductances was shifted towards larger conductances (Fig. 1C). Most notably, we did not find any mSOD1 lumbar motoneurons with

input conductances smaller than $0.2 \mu\text{S}$ whereas WT motoneurons with input conductances smaller than this value were commonly observed. At the other end of the conductance spectrum, a few mSOD1 motoneurons had input conductances larger than $0.8 \mu\text{S}$ but these large values were never observed in WT motoneurons. On average, the input conductance increased from $0.37 \pm 0.16 \mu\text{S}$ ($0.10\text{--}0.77 \mu\text{S}$, $n = 49$) in WT mice to $0.50 \pm 0.18 \mu\text{S}$ ($0.22\text{--}0.93 \mu\text{S}$, $n = 47$, one-tailed Wilcoxon–Mann–Whitney $P < 0.001$) in mSOD1 mice (i.e. a 35% average increase).

The mutation also induced an increase of the plateau conductance compared to controls ($P = 0.006$, ANCOVA), once again regardless of the age of the animal (no significant interaction between age and mutation factors, $P = 0.26$, ANCOVA test for parallelism). The plateau input conductance was $0.61 \pm 0.28 \mu\text{S}$ ($0.12\text{--}1.25 \mu\text{S}$, $n = 49$) on average in control animals, and it increased to $0.70 \pm 0.31 \mu\text{S}$ ($0.25\text{--}1.61 \mu\text{S}$, $n = 47$) on average in mSOD1 mice (one-tailed Wilcoxon–Mann–Whitney $P = 0.001$). However, the difference in sag ratio between the two populations of motoneurons was not significant (1.32 ± 0.26 , $n = 49$ vs. 1.38 ± 0.23 , $n = 47$; $P = 0.12$, ANCOVA), suggesting that the mutation causes the I_h current to increase in parallel with the input conductance.

The increase in average input conductance cannot be explained by the death of the small motoneurons as the whole spectrum of conductances is shifted toward larger values, with the emergence of high conductances never observed in WT motoneurons. Furthermore, at the age

at which our recordings were performed, no significant cell loss was observed in the spinal cord (Gurney *et al.* 1994; Chiu *et al.* 1995).

Despite the increased input conductance, excitability is unchanged in most mutant superoxide dismutase 1 motoneurons

The excitability of a neurone is determined by the amount of excitation (i.e. current) required to bring its membrane potential to firing threshold, and once firing has started, by the slope of its input–output relationship. To investigate whether the threshold current and the $F\text{--}I$ gain were modified, we studied the firing properties of mSOD1 and WT motoneurons in response to slow triangular ramps of currents. Figure 2 shows the responses of two typical motoneurons recorded in the same 39 day old mSOD1 mouse. As in WT animals, the motoneurons of mSOD1 mice exhibited a subprimary range where small subthreshold oscillations at high frequency preceded the emission of a full-blown spike (arrowheads in Fig. 2*Ab* and *Bb*; Manuel *et al.* 2009). This range was followed by the classical primary range where subthreshold oscillations were absent (Fig. 2*Ac* and *Bc*). During the descending ramp, oscillations reappeared at the end of the discharge. However, the response to the slow triangular ramps was asymmetric. In most cases (17 of 20 or 85% in mSOD1 mice; 22 of 31 or 71% in WT mice), the de-recruitment current was higher than the recruitment current and the $F\text{--}I$ relationship

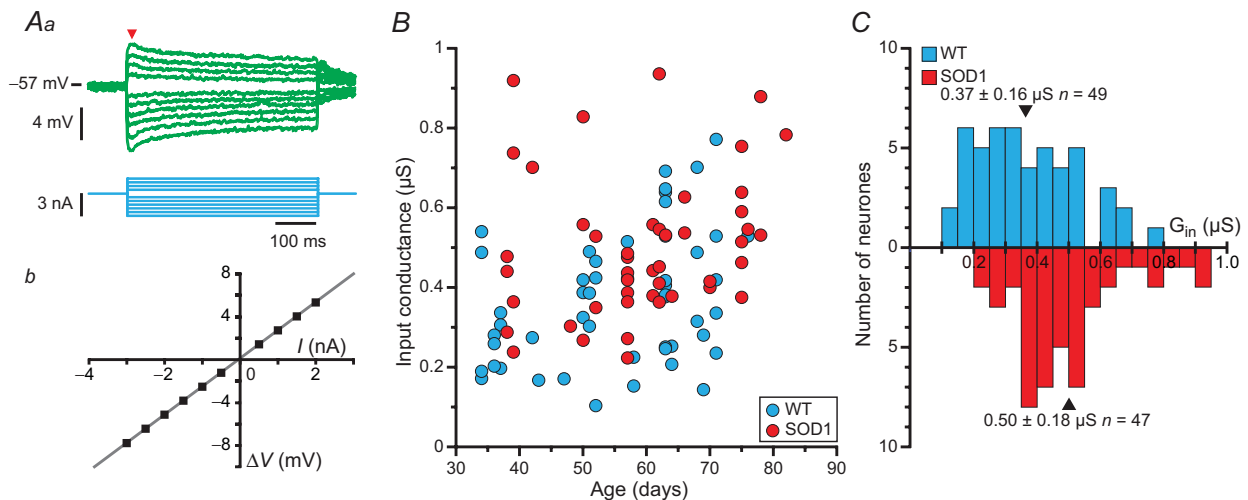


Figure 1. mSOD1 motoneurons have a larger input conductance than WT motoneurons

Aa, average responses of a mSOD1 motoneuron (top traces; each trace is an average of five sweeps) to a series of current pulses (bottom traces) lasting 500 ms and ranging from -3 to $+2$ nA. Notice the sag on the voltage response of the motoneuron: the voltage rapidly reached a peak, before stabilizing to a lower plateau value. Ab, plot of the deflection of the voltage (ΔV , measured at the peak of the response, arrowhead in Aa) versus the intensity of the current pulse. B, plot of the input conductances of WT and mSOD1 motoneurons versus the age of the mice. C, distribution of the input conductances (G_{in}) of WT (top) and mSOD1 (bottom) motoneurons. In each histogram, arrowheads mark the position of the mean. mSOD1, mutant superoxide dismutase 1; WT, wild-type.

displayed a clockwise hysteresis (Fig. 2*Ad*). In the other cases (three of 20 or 15% in mSOD1 mice; nine of 31 or 29% in WT mice), the recruitment current was lower and the F – I relationship displayed a counter clockwise hysteresis (Fig. 2*Bd*; no difference in the proportions of clockwise and counter clockwise hystereses between WT and mSOD1 motoneurons, $P = 0.32$, Fisher's exact test). All these features (subprimary range preceding the primary range, clockwise or counter clockwise hysteresis) were similar to those that we previously described in lumbar motoneurons of WT mice (Manuel *et al.* 2009; Iglesias *et al.* 2011).

Remarkably, the recruitment current was not different in the motoneurons of WT and mSOD1 mice. The recruitment current was highly correlated to the input conductance: the larger the input conductance, the higher the recruitment current (WT: Pearson product–moment correlation coefficient $r = 0.64$, $P < 0.0001$ vs. mSOD1: $r = 0.85$, $P < 0.0001$; WT and mSOD1 regressions are not significantly different, $P = 0.68$, ANCOVA; Fig. 3*A*), just as in normal motoneurons in other species (Fleshman *et al.*

1981; Gustafsson & Pinter, 1984; Zengel *et al.* 1985). The recruitment current spanned the same range in mSOD1 (2.1–11.4 nA) as in WT mice (1.2–12.6 nA) and the average values were not significantly different (WT: 5.0 ± 3.5 nA, $n = 37$ vs. mSOD1: 6.0 ± 3.0 nA, $n = 29$; $P = 0.11$, two-tailed Wilcoxon–Mann–Whitney; Fig. 3*B*). Moreover, the gain in the primary range was similar in the two populations of motoneurons (Fig. 4*A*). The gain was 18.0 ± 9.7 Hz nA^{−1} (7–40 Hz nA^{−1}; $n = 23$) in WT mice and 16.2 ± 6.7 Hz nA^{−1} (9–32 Hz nA^{−1}, $n = 12$; $P = 0.85$, two-tailed Wilcoxon–Mann–Whitney) in mSOD1 mice. Altogether, excitability in mSOD1 motoneurons is unchanged despite the input conductance increase.

The lack of change in recruitment current was not due to a parallel hyperpolarization of the voltage threshold for spiking (WT: −64 to −28 mV, -51 ± 8 mV, $n = 35$ vs. mSOD1: −64 to −30 mV, -49 ± 8 mV, $n = 18$; $P = 0.3$, two-tailed Wilcoxon–Mann–Whitney; Fig. 4*B*), nor to a depolarization of the resting membrane potential (WT: −81 to −50 mV, -66 ± 9 mV, $n = 49$ vs. mSOD1: −83 to −50 mV, -63 ± 9 mV, $n = 51$; $P = 0.15$, two-tailed

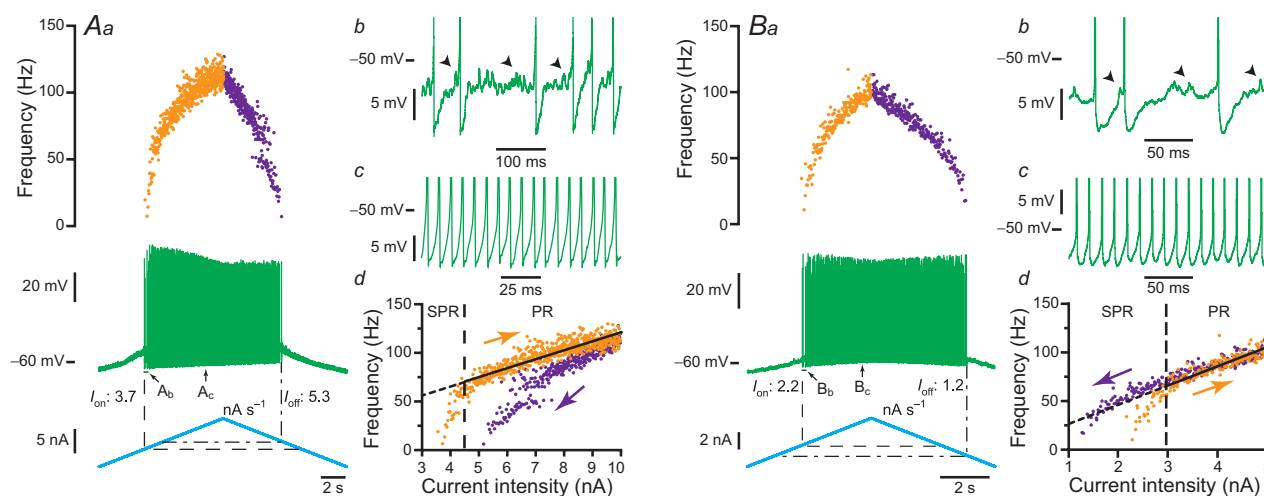


Figure 2. Most mSOD1 motoneurons fire repetitively in response to current ramps

A, clockwise response of an mSOD1 motoneurone to a slow ramp (1 nA s^{−1}) of current. **Aa**, slow current ramp (bottom trace), voltage response (middle trace) and instantaneous firing frequency (top plot). The onset of the discharge is shown by the vertical dashed line (I_{on} , 3.7 nA) while the current of de-recruitment (I_{off} , 5.3 nA) is indicated by the vertical dash-dotted line. **Ab**, magnification of the voltage trace at the recruitment (region indicated in **Aa**). Spikes have been truncated to highlight the high-frequency oscillations (arrowheads) that appeared in the interspike intervals. Note the firing variability that characterizes the SPR. **Ac**, magnification of the region indicated in **Aa**. Increasing the injected current resulted in a PR without oscillation between spikes and with less variability. **Ad**, plot of the instantaneous firing frequency versus the intensity of the injected current for the ascending and descending branches of the ramp shown in **Aa**. Note that this F – I relationship displayed a clockwise hysteresis. Vertical dashed line indicates the transition between the SPR and the PR on the ascending branch. The gain of the F – I curve can be estimated by the slope of the linear regression (continuous line) in the PR. **B**, counter-clockwise behaviour of another mSOD1 motoneurone in response to a slow ramp (1 nA s^{−1}) of current. **Ba**, same organization as in **Aa**. Note that, in this motoneurone, the de-recruitment current (I_{off} , 1.2 nA) is lower than the recruitment current (I_{on} , 2.2 nA). **Bb**, magnification of the voltage trace at recruitment (region indicated in **Ba**). High-frequency voltage oscillations (arrowheads) were present between spikes as for the motoneurone illustrated in **A**. **Bc**, magnification of region indicated in **Ba**. **Bd**, same organization as in **Ad**. Note that the F – I relationship of this motoneurone displayed counter-clockwise hysteresis. PR, primary range; mSOD1, mutant superoxide dismutase 1; SPR, subprimary range.

Wilcoxon–Mann–Whitney). The resting membrane potential did not change despite the increase in I_h current. This suggests that the leak conductance increased in parallel with I_h as both conductances have an opposite effect on the resting membrane potential.

Instead, the fact that recruitment current was unaltered despite the increased input conductance might be due to an upregulation of subthreshold depolarizing currents. Supporting this assumption, we often observed an acceleration of the voltage trajectory before the first spike on a current ramp (compare Fig. 3*Ca* and *Cb*). As a consequence, the recruitment current (measured current) was smaller than the theoretical current that would be

expected if only leak currents were present before the initiation of the first spike (i.e. linear voltage trajectory). The difference between the theoretical current (estimated by extrapolating the linear voltage trajectory close to rest until it reached the voltage threshold) and the measured current was larger in mSOD1 motoneurons (1.9 ± 1.6 nA, $n = 14$) than in WT motoneurons (0.7 ± 1.0 ; $n = 33$; $P = 0.002$, one-tailed Wilcoxon–Mann–Whitney). This suggests that some subthreshold depolarizing currents are upregulated in mSOD1 motoneurone providing the basis for homeostatic regulation of motoneurone excitability. This acceleration in membrane potential in motoneurons is probably due to the action of a persistent sodium

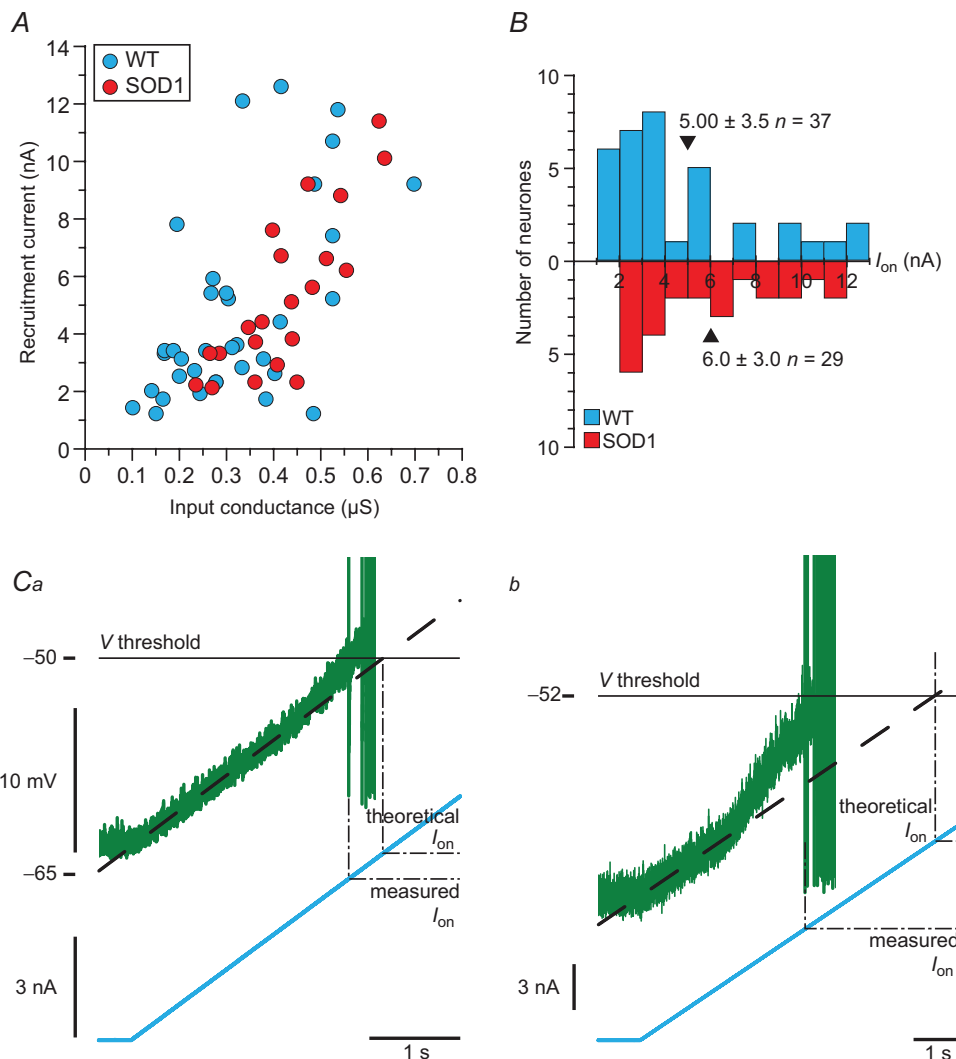


Figure 3. mSOD1 motoneurons are not hyperexcitable: onset current

A, plot of the recruitment current of WT and mSOD1 motoneurons versus input conductance. B, distributions of recruitment current of WT and mSOD1 motoneurons. The mean values are indicated by arrowheads. C, magnification of the voltage (top trace) and current (bottom trace) near the recruitment of a WT (Ca) and mSOD1 (Cb) motoneurone (the mSOD1 motoneurone is the one illustrated in Fig. 2A). I_{on} is measured as the current intensity at which the motoneurone fires the first spike ('measured I_{on} ', dashed line), while the 'theoretical I_{on} ' is the current intensity that would be needed to reach the same voltage threshold if the membrane was purely passive (dot-dashed line). mSOD1, mutant superoxide dismutase 1; WT, wild-type.

current (Harvey *et al.* 2006; Kuo *et al.* 2006). An increase in persistent sodium current has previously been demonstrated in mSOD1 motoneurons in the neonate (Quinlan *et al.* 2011) and thus the present result suggests that this increase persists in the adult state.

A fraction of motoneurons are hypoexcitable

In contrast, not all mSOD1 motoneurons were able to produce a repetitive discharge during the ramp of current. Some motoneurons only fired a few spikes during the ascending ramps (Fig. 5*Aa*) while others were not able to fire at all (Fig. 5*Ba*) despite the fact that all motoneurons were nevertheless able to emit a single spike in response to a brief pulse of current (see Fig. 5*Ab* and *Bb*).

Remarkably, these motoneurons lost their ability to produce a sustained discharge before their neuromuscular junctions stopped working. Figure 5*Ab* shows that the neuromuscular junctions of this motoneuron can be reliably activated at a rate of 30 Hz when triggering spikes with short pulses of current. This suggests that the loss of function in the motoneuron cell body (inability to produce sustained firing) preceded the peripheral functional impairment.

Among 38 tested motoneurons in mSOD1 mice, only 22 (58%) were able to produce sustained firing during the slow ramps of currents (bottom solid bars and pie chart, Fig. 6*A*). Twelve (32%) failed to discharge a single action potential during the slow ramps despite the fact that they

were still able to fire one spike in response to a short current pulse (bottom crosshatched bars and pie chart, Fig. 6*A*). Four more motoneurons (10%) produced only a few spikes during the ramp (bottom hatched bars and pie chart, Fig. 6*A*). Interestingly, the input conductances of those motoneurons (that failed to respond to a slow ramp or that exhibited a poor response) were spread in the full range of input conductances of mSOD1 motoneurons. In sharp contrast, 36 motoneurons of the 41 tested (88%) in WT mice produced sustained firing during a slow ramp of current (top solid bars, Fig. 6*A*) whereas only three (7%) did not discharge at all during the ramp (though they could fire one spike in response to a current pulse, top crosshatched bars, Fig. 6*A*) and only two (5%) discharged only a few spikes during the ramp (top hatched bars; Fig. 6*A*). Moreover, those motoneurons that failed to produce sustained firing during the ramp were restricted to those that had the highest input conductance (above 0.42 μ S). Overall, the proportion of motoneurons in mSOD1 mice that failed to produce a good repetitive firing in response to a slow ramp of current was much higher than in WT mice (16 of 38 for mSOD1 mice vs. five motoneurons of 41 for WT mice; $P = 0.004$, Fisher's exact test) and their input conductances are spread across the full spectrum of input conductances, unlike in WT mice.

The contrast between motoneurons from WT and mSOD1 mice is even more striking in the time window P34–P60 (Fig. 6*B*), that is to say the period just preceding and during the very first denervations of neuromuscular

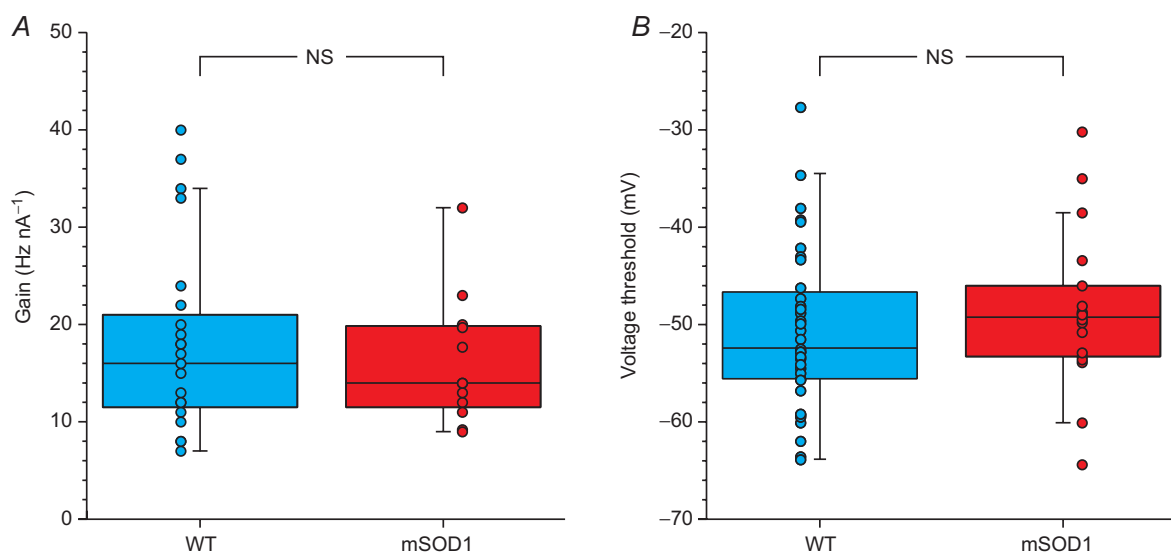


Figure 4. mSOD1 motoneurons are not hyperexcitable: *F-I* gain and voltage threshold

A, box-and-whisker diagram and data points of the distribution of the gain (measured in the primary range) of WT and mSOD1 motoneurons. *B*, box-and-whisker diagram and data points of the distribution of the voltage threshold of WT and mSOD1 motoneurons. In both diagrams, the central box represents the values from the lower to upper quartile (25–75th percentile). The middle line represents the median. The vertical line extends to the minimum and maximum values that fall within 1.5 times the interquartile distance. mSOD1, mutant superoxide dismutase 1; NS, not significant; WT, wild-type.

junction (Pun *et al.* 2006; Hegedus *et al.* 2007, 2008). At this time period, all 21 WT lumbar motoneurons displayed full repetitive firing in response to a slow ramp (top solid bars and pie chart, Fig. 6B). However, only 11 of 17 mSOD1 lumbar motoneurons (65%) were able to produce sustained firing (bottom solid bars and pie chart, Fig. 6B). The six others (35%) were unable to discharge a single spike during the ramp despite being able to fire one spike in response to a short pulse (bottom crosshatched bars and pie chart, Fig. 6B; $P = 0.004$, Fisher's exact test). Again their input conductances spanned the full range of input conductances of mSOD1 motoneurons. These results clearly indicate that, in mSOD1 mice, a large fraction of motoneurons were unable to fire repetitively and therefore were less excitable.

Changes in spike generating mechanisms in hypoexcitable motoneurons

In neonatal cells, a primary compensation for the increase in input conductance is an increase in persistent inward sodium currents. As demonstrated by Kuo *et al.* (2006), Miles *et al.* (2005) and others (Lee & Heckman, 2001;

Harvey *et al.* 2006; Bouhadjane *et al.* 2013), a deficit in persistent sodium current prevents a motoneurone from producing sustained firing in response to long current pulses or slow ramps of current. If the failure of spike generation in hypoexcitable cells is indeed due to failure of the persistent sodium current to keep up with increased input conductance, then the hypoexcitable cells should exhibit two behaviours: there should be a lack of a upswing in membrane depolarization just before spike onset (a behaviour generated by persistent sodium current) and the cells should still spike to sharp transient inputs (as these rapidly rising inputs do not need the assistance of the upswing in membrane potential).

Consistent with these predictions, all the motoneurons that failed to produce a sustained discharge were able to emit a single spike in response to a brief pulse of current (see above). Furthermore, the voltage upswing observed in motoneurons that fire repetitively is absent in the motoneurons that fire only a few spikes in response to a slow current ramp. Figure 7 shows the upswings (empty arrowheads) in two motoneurons that are able to produce a sustained firing (mSOD1 and WT motoneurone, top two traces, respectively). In sharp contrast the voltage

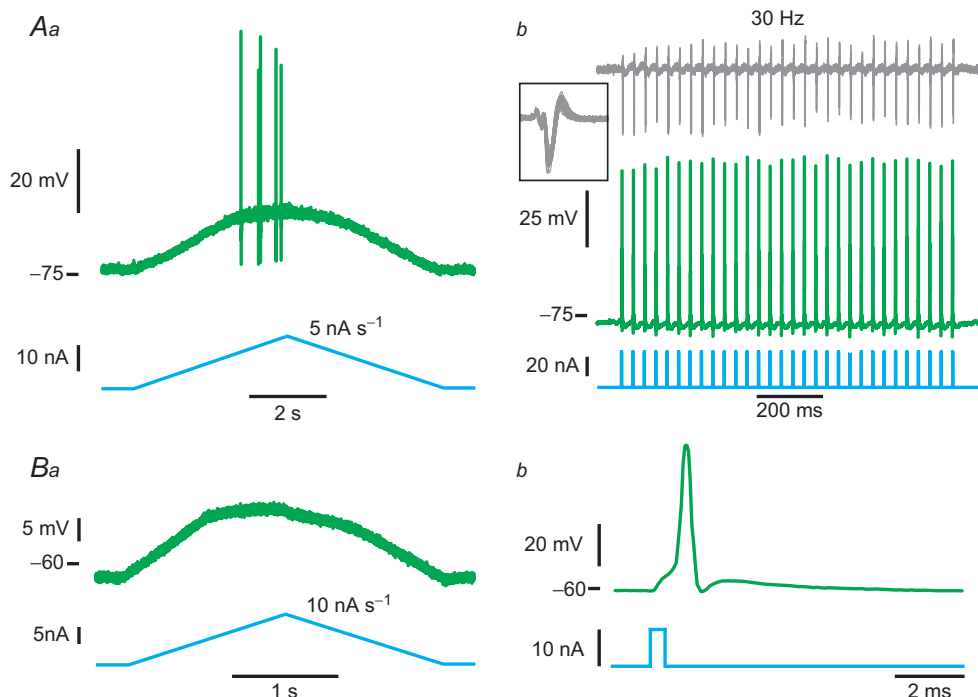


Figure 5. Some mSOD1 motoneurons are hypoexcitable

A, example of an mSOD1 motoneurone that fired only a few spikes in response to slow current ramps. Aa, current ramp (bottom trace) and voltage response (top trace). Ab, this motoneurone was nevertheless able to fire single spikes (middle trace) in response to a train of brief current pulses (bottom trace) and its neuromuscular junction was still functional, as shown by the fact that electromyography activity (top trace) was consistently observed following each spike (inset: superposition of all the electromyography sweeps showing very little variability). B, example of an mSOD1 motoneurone that was unable to fire any spike in response to slow current ramps. Ba, current ramp (bottom trace) and voltage response (top trace). Bb, this motoneurone was nevertheless able to fire a single spike (top trace) in response to a brief pulse of current (bottom trace). mSOD1, mutant superoxide dismutase 1.

trajectory of the mSOD1 motoneurone unable to produce a sustained firing (bottom trace) plateaus below the expected passive trajectory (dashed line) just before firing the first spike (filled arrowhead). These motoneurons needed more current to reach their firing threshold than what would be expected if the motoneurons were purely passive (the difference between the theoretical current and the measured current was negative: -0.5 ± 0.4 nA, $n = 4$). These results support a role for a relative reduction of the persistent sodium current as a major mechanism of the development of hypoexcitability.

The lack of hyperexcitability is not due to anaesthetics: *in vitro* study of sacrocaudal motoneurons of mutant superoxide dismutase 1 mice

Our results show that lumbar motoneurons either successfully maintain their excitability or become hypoexcitable as suggested by their inability to produce sustained firing in response to ramps of current. Altogether these results indicate that lumbar motoneurons are not

hyperexcitable in mSOD1 mice. However, we performed these experiments on deeply anaesthetized mice, and it has been shown that the anaesthetics that we used can suppress voltage-dependent currents that have a profound effect on the excitability of motoneurons (Guertin & Hounsgaard, 1999). One might therefore wonder whether mSOD1 motoneurons could turn out to be hyperexcitable in non-anaesthetized conditions. For technical reasons, it is extremely difficult to perform intracellular recordings of adult lumbar motoneurons in conditions where no anaesthetics are used (lumbar cord *in vitro* or decerebrate mouse *in vivo*). Instead, we recently developed a preparation in which it is possible to record adult motoneurons *in vitro* in the sacrocaudal region of the spinal cord (Jiang & Heckman, 2006; Manuel *et al.* 2012). Even though we cannot record lumbar motoneurons in these conditions, tail muscles are atrophied and sacrocaudal motoneurons degenerate with a time course similar to the lumbar motoneurons in the SOD1 mouse model of ALS (Alves *et al.* 2011).

The sacrocaudal motoneurons have been recorded in a restricted time window (P40–P50), i.e. just

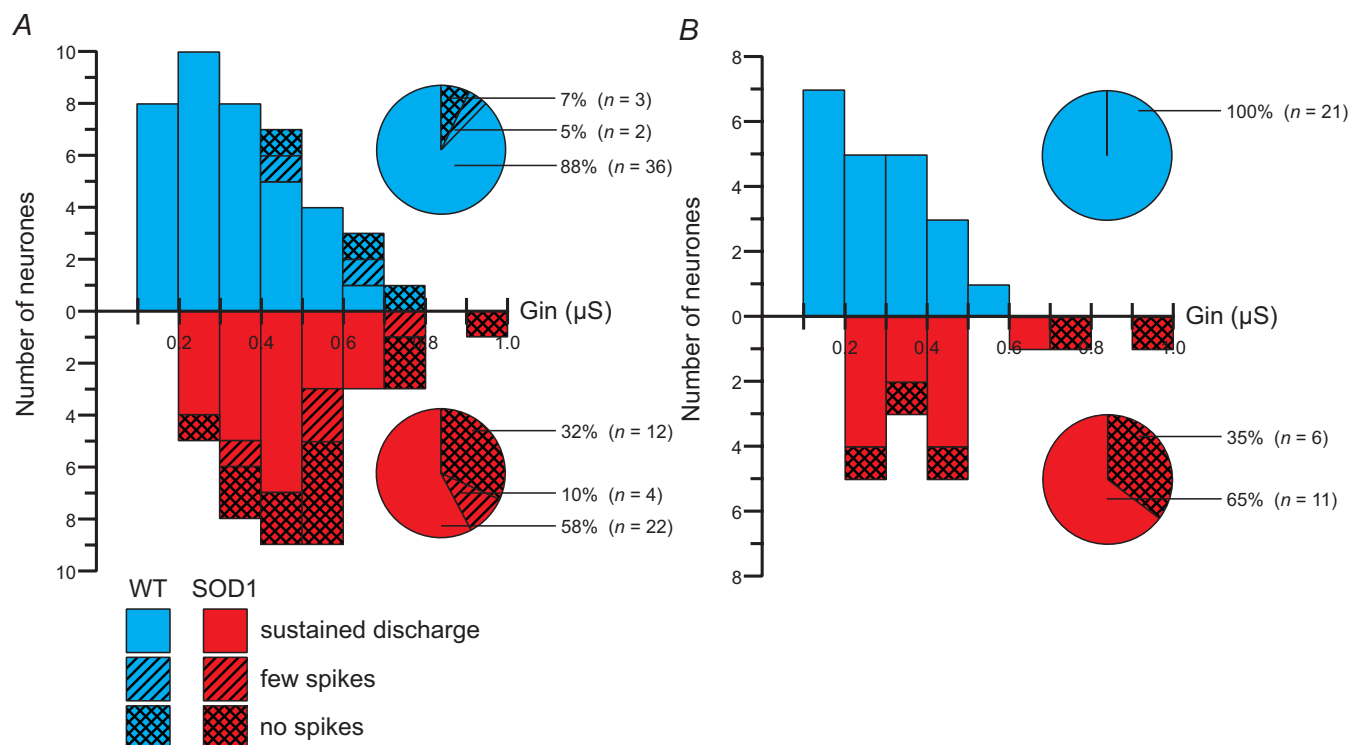


Figure 6. A larger proportion of motoneurons cannot fire repetitively in mSOD1 than in WT mouse lumbar spinal cords

A, distribution of input conductance (G_{in}) for different categories of WT (top) and mSOD1 (bottom) motoneurons aged between 34 and 82 days old. Solid bars correspond to motoneurons that were able to produce sustained firing, hatched bars correspond to motoneurons that fired only a few spikes, and crosshatched bars correspond to motoneurons unable to fire any spike during ramps of current. Pie charts indicate the proportions of each category among our population of WT (top pie chart) and mSOD1 (bottom pie chart) motoneurons. B, same organization as in A for a time window restricted to P34–P60. mSOD1, mutant superoxide dismutase 1; WT, wild-type.

before denervation. They displayed smaller input conductances than lumbar motoneurons, but, as above, the motoneuron input conductance was 46% larger in mSOD1 mice than in WT mice ($P < 0.001$, one-tailed Wilcoxon–Mann–Whitney; Fig. 8A and Table 1). The plateau input conductance was also significantly larger in sacrocaudal motoneurons of mSOD1 mice ($P < 0.001$, one-tailed Wilcoxon–Mann–Whitney; Table 1).

As with lumbar motoneurons, excitability was assessed using slow ramps of current. Sacrocaudal motoneurons usually responded to ramps of current with the same clockwise (Fig. 8Ba and Bb) or counter-clockwise hysteresis (not shown) as lumbar motoneurons. The recruitment current remained unchanged in the sacrocaudal motoneurons of mSOD1 mice compared to WT mice (Table 1). In addition, the F – I gain was not statistically different between mSOD1 mice and WT mice (Table 1). This suggests that excitability is maintained in these motoneurons. As in lumbar motoneurons, the lack of effect on recruitment current was not due to a decrease of the voltage threshold for spiking, nor to an increase in the resting membrane potential (see Table 1).

Similarly to lumbar motoneurons, a fraction of sacrocaudal motoneurons failed to respond to slow ramps of current (Fig. 8Ca), despite the fact that they could fire one spike at the onset of a current pulse. These motoneurons were never able to produce a strong repetitive firing, even in response to a strong current pulse (Fig. 8Cb; eight of 27 in mSOD1 mice, four of 32 in WT mice, Fig. 8D). Furthermore the input conductances of

the motoneurons that were unable to produce sustained firing were distributed among the full input conductance range in mSOD1 mice whereas they were restricted to the highest input conductances in WT mice (Fig. 8D).

Discussion

We showed that, in either the lumbar or the sacrocaudal region of the spinal cord, motoneurons of adult SOD1^{G93A} mice are not hyperexcitable. Instead, most of the motoneurons successfully maintained their excitability despite an increase of their input conductance. Their voltage threshold for spiking, their recruitment current and their F – I gain in the primary range were unchanged. Yet this excitability homeostasis failed in a substantial fraction of mSOD1 motoneurons, which lost their ability to fire repetitively in response to a quasi-stationary input, and therefore became less excitable. The lack of hyperexcitability was not caused by the use of anaesthetics, as we found the same results during *in vitro* experiments, in which no anaesthetics were used. Moreover, the lack of hyperexcitability cannot be explained by the death of the more excitable cells as, at the age at which our recordings were performed, no significant cell loss is observed in the spinal cord (Gurney *et al.* 1994; Chiu *et al.* 1995). For the same reason, the increase in input conductance cannot be explained by the death of small motoneurons. In spinal motoneurons of neonatal mSOD1 mice, the increased input conductance was shown to be caused in part by morphological alterations (Elbasiouny *et al.* 2010). Similar explanations might hold true in adults.

The excitotoxicity hypothesis in amyotrophic lateral sclerosis

The excitotoxicity hypothesis rests on several indirect findings, such as the fact that riluzole, the only drug shown to have a beneficial, albeit small, effect on the progression of the disease (Lacomblez *et al.* 1996), is a glutamate release inhibitor and a blocker of voltage-activated sodium channels (Bellingham, 2011), which could decrease glutamate toxicity. The excitotoxicity hypothesis has received a lot of support from the fact that patients with ALS have elevated levels of glutamate in their plasma and cerebrospinal fluid (Rothstein *et al.* 1990) as well as from transcranial magnetic stimulation studies in patients with sporadic and familial ALS (Vucic *et al.* 2008).

So far, the excitotoxicity hypothesis has only been investigated in mSOD1 mice. It remains the best model currently available to study the progressive and selective motoneuron death, the hallmark of ALS, as other models (e.g. based on TDP-43 transgenes) do not adequately replicate some aspects of neuromuscular degeneration (Van Den Bosch, 2011).

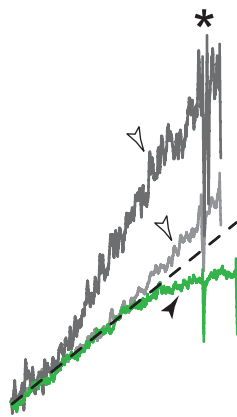


Figure 7. Comparison of voltage trajectories before the first spike emitted in response to a slow current ramp in motoneurons able and unable to produce repetitive firing

Traces were smoothed using a 10 ms window, aligned to the first spike (asterisk) and scaled so that the passive voltage trajectory (dashed line) was the same in all traces. The top trace corresponds to a mutant superoxide dismutase 1 motoneuron that was able to produce repetitive firing (same motoneuron as in Figs 2A and 3Cb), the middle trace is from a wild-type motoneuron (same motoneuron as in Fig. 3Ca), and the bottom trace is from the motoneuron in Fig. 5Aa.

Motoneurone hyperexcitability: an early but transient event in mutant superoxide dismutase 1 mice

Spinal motoneurones recorded in whole spinal cords *in vitro* or in culture from mSOD1 embryos have been shown to be hyperexcitable: they are recruited at lower currents and display higher F - I gains (Pieri *et al.* 2003; Kuo *et al.* 2005; Martin *et al.* 2013). This is partly due to an upregulation of the sodium persistent inward current

(Kuo *et al.* 2005). In addition, the recovery from fast inactivation of the sodium current proved to be faster in mSOD1 motoneurones contributing to their hyperexcitability (Zona *et al.* 2006).

At a later stage, in neonatal animals, both sodium and calcium persistent currents were shown to be upregulated (Quinlan *et al.* 2011). However, this upregulation did not result in hyperexcitability as the recruitment current and

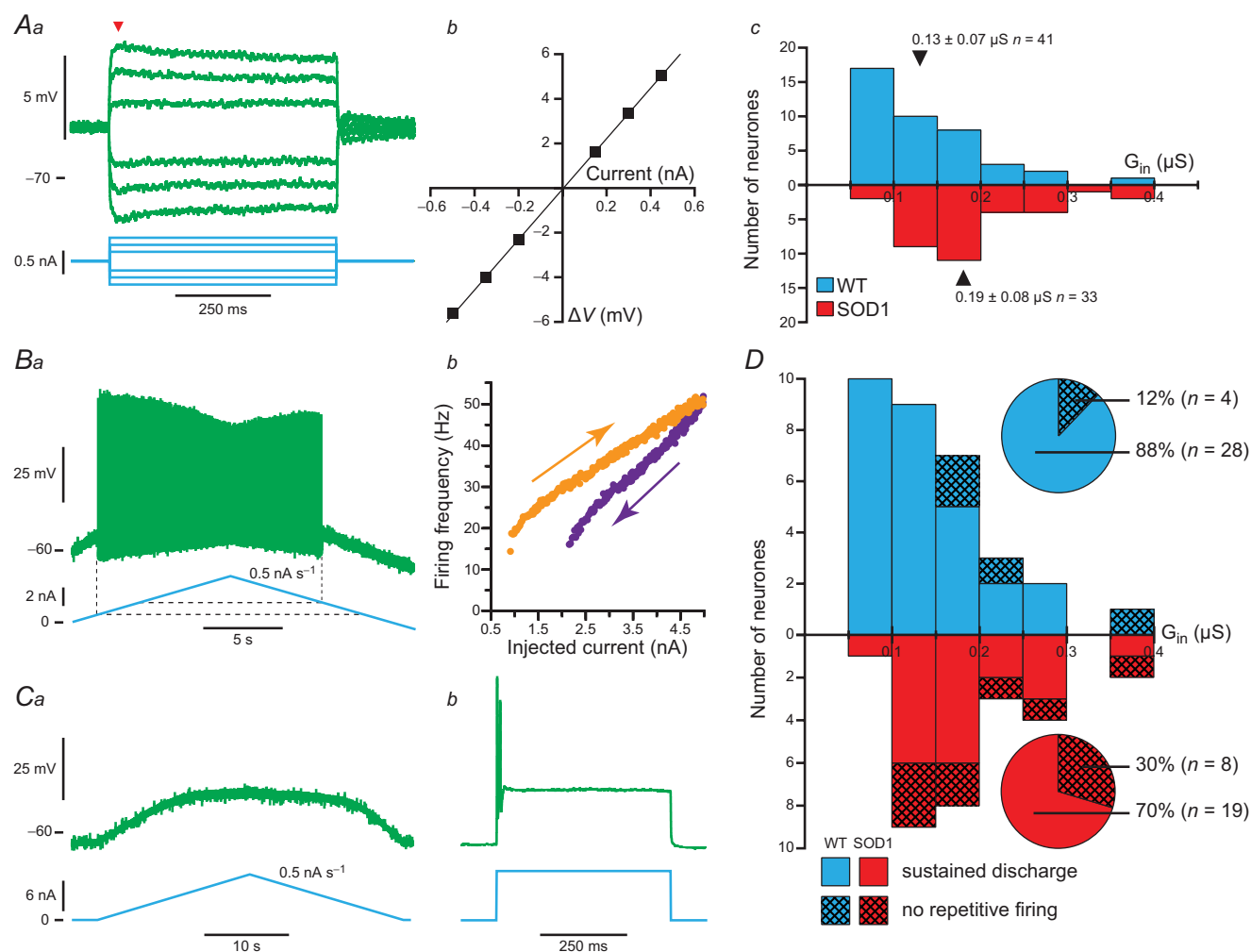


Figure 8. The electrophysiological properties of adult mouse sacrocaudal motoneurones recorded *in vitro* are similar to those observed in the lumbar cord *in vivo*

Aa, voltage response (top traces) to a series of subthreshold current pulses (bottom traces). Each trace is the average of five sweeps. Ab, plot of the voltage deviation (ΔV) measured at the peak of the response (arrowhead in Aa) versus the intensity of the current pulse, used to estimate the input conductance of the cell. Ac, histogram of the input conductances (G_{in}) of WT (top histogram) and mSOD1 (bottom histogram) sacrocaudal motoneurones. The mean values are indicated by arrowheads. B, example of a sacrocaudal WT motoneurone that was able to sustain a repetitive discharge in response to a stationary stimulus. Ba, response (top trace) to a slow current ramp. The dashed lines indicate the onset and de-recruitment currents. Bb, F - I relationship of that motoneurone. Note that it displayed a clockwise hysteresis. C, example of a sacrocaudal mSOD1 motoneurone that was unable to produce sustained firing in response to stationary stimuli. Ca, this motoneurone was unable to fire a single spike (top trace) in response to a slow ramp of current (bottom trace). Cb, this motoneurone was nevertheless able to fire at most a doublet of spikes (top trace) at the onset of a square pulse (bottom trace). D, input conductances (G_{in}) of sacrocaudal motoneurones that fired (solid bars) or that failed to fire (crosshatched bars) during ramps in WT and mSOD1 mice. Pie charts indicate the proportions of each category among our population of WT (top pie chart) and mSOD1 (bottom pie chart) motoneurones. mSOD1, mutant superoxide dismutase 1; WT, wild-type.

Table 1. Comparison of electrophysiological properties between mSOD1 and WT sacrocaudal motoneurons

	WT	mSOD1	Significance
Resting membrane potential	-61 ± 4 mV [−69 to −55] $n = 41$	-62 ± 5 mV [−75 to −55] $n = 33$	$P = 0.61$ (NS)
Peak input conductance	0.13 ± 0.07 μ S [0.05 – 0.35] $n = 41$	0.19 ± 0.08 μ S [0.09 – 0.38] $n = 33$	$P < 0.001$ (***)
Plateau input conductance	0.16 ± 0.10 μ S [0.05 – 0.45] $n = 41$	0.22 ± 0.10 μ S [0.09 – 0.55] $n = 33$	$P < 0.001$ (***)
Sag ratio	1.17 ± 0.14 [1.00 – 1.68] $n = 41$	1.17 ± 0.14 [1.00 – 1.56] $n = 32$	$P = 0.73$ (NS)
Recruitment current (I_{on})	3.5 ± 2.4 nA [0.4 – 9.1] $n = 24$	3.3 ± 1.7 nA [0.7 – 6.4] $n = 18$	$P = 0.88$ (NS)
Gain in primary range	8 ± 5 Hz nA ^{−1} [2 – 20] $n = 17$	10 ± 4 Hz nA ^{−1} [5 – 20] $n = 14$	$P = 0.15$ (NS)
Voltage threshold	-44 ± 6 mV [−53 to −33] $n = 14$	-41 ± 8 mV [−52 to −21] $n = 18$	$P = 0.40$ (NS)

In each cell is given the average value \pm s.d., the range of values, and the number of observations. Abbreviations: mSOD1, mutant superoxide dismutase 1; NS, not significant; WT, wild-type.

the F – I gain were the same in mSOD1 and WT mice (Quinlan *et al.* 2011). Similarly, in another ALS model, the SOD1^{G85R} mouse, spinal motoneurons did not exhibit changes in rheobase or stationary F – I gain (Pambo-Pambo *et al.* 2009). This might be due to the fact that, at this time point, the input conductance of spinal motoneurons is significantly larger in mSOD1 mice (in both the G93A and G85R mutants) than in WT mice (Bories *et al.* 2007; Quinlan *et al.* 2011). It thus appears that the upregulation of inward currents just compensates for the increase of the input conductance to preserve the net excitability.

This still holds true in adults as we have shown that excitability is unchanged in most spinal motoneurons despite the continuing conductance increase. The fact that the voltage upswing before the initiation of the first spike is larger in mSOD1 motoneurons compared to WT motoneurons strongly suggests an upregulation of inward currents. However, a substantial fraction of motoneurons was not able to fire in response to a quasi-stationary input (slow ramp of current) indicating that the homeostatic regulation of excitability has failed in these motoneurons. The fact that the voltage trajectory levels off just before emission of the first spike suggests that the upregulation of the persistent sodium current is unable to keep up with the increase in leak current in those motoneurons. Indeed, a deficit in persistent sodium current prevents repetitive firing of motoneurons but still allows spiking in response to transient inputs (Lee & Heckman, 2001; Kuo *et al.* 2006). However we

cannot exclude a contribution from an upregulation of potassium currents. At this point in time, it is not possible to directly measure the amplitude of currents in adult mouse motoneurons. Voltage clamp recordings of spinal motoneurons are extremely difficult to perform *in vivo* and pharmacological manipulation of ionic currents cannot be achieved in these conditions. Moreover, we have been unsuccessful in performing reliable voltage clamp recordings of sacrocaudal motoneurons in our *in vitro* preparation.

Hypoexcitability occurred before the motor units have started to degenerate as we found that their neuromuscular junctions can still work normally. However, the reduced activity of hypoexcitable motoneurons probably does not cause the degeneration of neuromuscular junctions, as a block of the axons by TTX has no impact on the degeneration time course of neuromuscular junctions in SOD1^{G93A} mice (Carrasco *et al.* 2012). One interesting possibility is that the hypoexcitability may help preserve motoneuron survival by restricting the calcium inflow to the cell body. On the other hand hypoexcitability would contribute to weak force production. Whatever the case, the progression of hypoexcitability within the motor pools might be considered as a marker of the disease progression.

In another model (SOD1^{G127X} mice), the input conductance was not increased in adults, but the excitability was also unchanged as the rheobase and the gain was not modified (Meehan *et al.* 2010). In these mice, a secondary range of firing (i.e. an increase of

the F - I gain following the primary range, supposedly due to activation of a calcium persistent current) was observed and appeared at lower frequencies in mSOD1 animals (on average 133 Hz) than in WT (167 Hz) suggesting an increase of the calcium persistent inward current. However, such high-frequency firing is probably unphysiological. In mouse motor units the tetanic force is reached near the transition between the subprimary range and the primary range, which occurs at much lower frequencies (32–75 Hz; Manuel & Heckman, 2011). Our results differ substantially from those of Meehan *et al.* (2010), as we observed a proportion of motoneurons that become hypoexcitable. However, the comparison between our respective results is difficult given the fact that they used a different model, in which the time of denervation is unknown. It is therefore possible that they have studied motoneurone excitability at a different stage of the disease.

Our present results, obtained in adult SOD1^{G93A} mice, demonstrate therefore that the hyperexcitability observed at very early developmental stages does not persist into adulthood. The transient nature of the intrinsic hyperexcitability in mSOD1 mice is not restricted to spinal motoneurons. It also occurs in hypoglossal motoneurons. However, the time course of the hyperexcitability may somehow be different than in spinal motoneurons. Indeed, hypoglossal motoneurons are hyperexcitable in neonates (van Zundert *et al.* 2008). However at end stage, they are no longer hyperexcitable; the recruitment current, the F - I gain and the intensity of persistent inward currents are the same in mSOD1 mice and in controls (Fuchs *et al.* 2013).

Excitotoxicity might be induced by alterations of excitatory or inhibitory inputs to motoneurons

As spinal motoneurons are intrinsically hyperexcitable only transiently, weeks before they start to degenerate, it is unlikely that hyperexcitability contributes by itself to the degeneration process. However, excitotoxicity could still be induced by an alteration in the synaptic inputs received by the motoneurone, leading to an excessive excitation. A reduction of the inhibitory inputs or an increase of the excitatory inputs would lead to higher firing rates, thereby increasing the calcium concentration in the cytoplasm. Moreover, an increased glutamatergic excitation could by itself induce an excessive calcium influx through the AMPA/Kainate receptors because the GluR2 subunit is lacking in motoneurons (Rao & Weiss, 2004). Evidence for alterations of both the inhibitory and excitatory synaptic inputs impinging on motoneurons, as well as the properties of their postsynaptic receptors have been reported (Carunchio *et al.* 2008; Jiang *et al.* 2009; Chang & Martin, 2011; Sunico *et al.* 2011).

Motoneurons are also under the external influence of neuromodulatory descending pathways that can

affect their excitability and firing. In particular, spinal motoneurons are highly sensitive to serotonergic inputs that tend to increase excitability through modulation of (among others) calcium-activated potassium currents, hyperpolarization activated inward currents and persistent inward currents (Perrier *et al.* 2013). In our experimental conditions, these effects are minimal due to the depth of the anaesthesia (*in vivo* experiments) or absence of serotonin in the recording solution (*in vitro* experiments). Yet, motoneurons in ALS might not become hyperexcitable under the action of serotonergic inputs as there is evidence that serotonergic pathways degenerate in ALS (Sandyk, 2006; Dentel *et al.* 2013). However, degeneration of serotonergic axons could lead to a modification of post-synaptic receptors causing them to become constitutively active (Murray *et al.* 2010), and eventually leading to spasticity (Bennett *et al.* 2001). Evidence for this phenomenon has been found in ALS, but only at very advanced stages of the disease (Dentel *et al.* 2013), which makes it unlikely a primary cause of the degeneration. Indeed, at the time points studied in our *in vitro* experiments, we did not find any motoneurons displaying the firing profiles characteristic of spasticity due to loss of serotonergic inputs (type 4 F - I relationship in Bennett *et al.* 2001).

The superoxide dismutase 1 mutation affects all spinal motoneurons, regardless of their physiological type

There is a well-known relationship between the input conductance of a motoneurone and the physiological type of its motor unit: small motoneurons of slow contracting motor units (S) display the smallest input conductances whereas large motoneurons of fast contracting and fatigable motor units (FF) have the largest input conductances, motoneurons of fast contracting fatigue-resistant motor units (FR) being of intermediate size (Burke, 1981; Gustafsson & Pinter, 1984; Zengel *et al.* 1985; see also Manuel & Heckman, 2012*b* for preliminary data on mouse motor units). A salient result of our present work is that the whole spectrum of input conductances is shifted towards larger values. Moreover, the input conductances of motoneurons that turned into a less excitable state are distributed over the full range of input conductances. Hypoexcitability is therefore not restricted to a motoneurone subtype. Altogether our results strongly suggest that all motoneurons are affected regardless of the physiological type of their motor unit.

However, in SOD1^{G93A} mice, FF motor units degenerate first, followed by FR motor units; whereas S motor units do not degenerate (Pun *et al.* 2006; Hegedus *et al.* 2007, 2008). As the ratio of excitatory *versus* inhibitory synapses is larger in FF motoneurons than in S motoneurons

(Conradi *et al.* 1979; Kellerth *et al.* 1983; Brannstrom, 1993), we might speculate that FF motoneurons would be much more affected than S motoneurons by a shift in the balance between excitation and inhibition (Sunico *et al.* 2011), which might explain their greater vulnerability.

References

- Alves CJ, de Santana LP, dos Santos AJ, de Oliveira GP, Duobles T, Scorisa JM, Martins RS, Maximino JR & Chadi G (2011). Early motor and electrophysiological changes in transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis and gender differences on clinical outcome. *Brain Res* **1394**, 90–104.
- Bellingham MC (2011). A review of the neural mechanisms of action and clinical efficiency of riluzole in treating amyotrophic lateral sclerosis: what have we learned in the last decade? *CNS Neurosci Ther* **17**, 4–31.
- Bennett DJ, Li Y & Siu M (2001). Plateau potentials in sacrocaudal motoneurons of chronic spinal rats, recorded in vitro. *J Neurophysiol* **86**, 1955–1971.
- Bories C, Amendola J, Lamotte d'Incamps B & Durand J (2007). Early electrophysiological abnormalities in lumbar motoneurons in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurosci* **25**, 451–459.
- Bouhadjane M, Tazerart S, Moqrish A, Vinay L & Brocard F (2013). Sodium-mediated plateau potentials in lumbar motoneurons of neonatal rats. *J Neurosci* **33**, 15626–15641.
- Bowman A & Azzalini A (2010). R package 'sm': nonparametric smoothing methods, version 2.2–4 edn.
- Brannstrom T (1993). Quantitative synaptology of functionally different types of cat medial gastrocnemius alpha-motoneurons. *J Comp Neurol* **330**, 439–454.
- Burke R (1981). Motor units: anatomy, physiology, and functional organization. In *Handbook of Physiology The Nervous System Motor Control*, ed. Brooks V. American Physiological Society, Bethesda, MD.
- Carrasco DI, Bichler EK, Rich MM, Wang X, Seburn KL & Pinter MJ (2012). Motor terminal degeneration unaffected by activity changes in SOD1(G93A) mice; a possible role for glycolysis. *Neurobiol Dis* **48**, 132–140.
- Carunchio I, Mollinari C, Pieri M, Merlo D & Zona C (2008). GAB(A) receptors present higher affinity and modified subunit composition in spinal motor neurons from a genetic model of amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurosci* **28**, 1275–1285.
- Chang Q & Martin LJ (2011). Glycine receptor channels in spinal motoneurons are abnormal in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* **31**, 2815–2827.
- Chiu AY, Zhai P, Dal Canto MC, Peters TM, Kwon YW, Prattis SM & Gurney ME (1995). Age-dependent penetrance of disease in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Cell Neurosci* **6**, 349–362.
- Conradi S, Kellerth JO, Berthold CH & Hammarberg C (1979). Electron microscopic studies of serially sectioned cat spinal alpha-motoneurons. IV. Motoneurons innervating slow-twitch (type S) units of the soleus muscle. *J Comp Neurol* **184**, 769–782.
- Dentel C, Palamiuc L, Henriques A, Lannes B, Spreux-Varoquaux O, Gutknecht L, Rene F, Echaniz-Laguna A, Gonzalez de Aguilar JL, Lesch KP, Meininger V, Loeffler JP & Dupuis L (2013). Degeneration of serotonergic neurons in amyotrophic lateral sclerosis: a link to spasticity. *Brain* **136**, 483–493.
- Elbasiouny SM, Amendola J, Durand J & Heckman CJ (2010). Evidence from computer simulations for alterations in the membrane biophysical properties and dendritic processing of synaptic inputs in mutant superoxide dismutase-1 motoneurons. *J Neurosci* **30**, 5544–5558.
- Fleshman JW, Munson JB, Sybert GW & Friedman WA (1981). Rheobase, input resistance, and motor-unit type in medial gastrocnemius motoneurons in the cat. *J Neurophysiol* **46**, 1326–1338.
- Fuchs A, Kutterer S, Muhling T, Duda J, Schutz B, Liss B, Keller BU & Roeper J (2013). Selective mitochondrial Ca²⁺ uptake deficit in disease endstage vulnerable motoneurons of the SOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Physiol* **591**, 2723–2745.
- Guertin PA & Hounsgaard J (1999). Non-volatile general anaesthetics reduce spinal activity by suppressing plateau potentials. *Neuroscience* **88**, 353–358.
- Gurney ME, Pu H, Chiu AY, Dal Canto MC, Polchow CY, Alexander DD, Caliendo J, Hentati A, Kwon YW, Deng HX & *et al.* (1994). Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* **264**, 1772–1775.
- Gustafsson B & Pinter MJ (1984). Relations among passive electrical properties of lumbar alpha-motoneurons of the cat. *J Physiol* **356**, 401–431.
- Harvey PJ, Li Y, Li X & Bennett DJ (2006). Persistent sodium currents and repetitive firing in motoneurons of the sacrocaudal spinal cord of adult rats. *J Neurophysiol* **96**, 1141–1157.
- Hegedus J, Putman CT & Gordon T (2007). Time course of preferential motor unit loss in the SOD1 G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* **28**, 154–164.
- Hegedus J, Putman CT, Tyreman N & Gordon T (2008). Preferential motor unit loss in the SOD1 G93A transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Physiol* **586**, 3337–3351.
- Iglesias C, Meunier C, Manuel M, Timofeeva Y, Delestree N & Zytnicki D (2011). Mixed mode oscillations in mouse spinal motoneurons arise from a low excitability state. *J Neurosci* **31**, 5829–5840.
- Ilieva H, Polymenidou M & Cleveland DW (2009). Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond. *J Cell Biol* **187**, 761–772.
- Jiang MC & Heckman CJ (2006). In vitro sacral cord preparation and motoneuron recording from adult mice. *J Neurosci Methods* **156**, 31–36.
- Jiang M, Schuster JE, Fu R, Siddique T & Heckman CJ (2009). Progressive changes in synaptic inputs to motoneurons in adult sacral spinal cord of a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* **29**, 15031–15038.
- Kellerth JO, Conradi S & Berthold CH (1983). Electron microscopic studies of serially sectioned cat spinal alpha-motoneurons: V. motoneurons innervating fast-twitch (type FF) units of the gastrocnemius muscle. *J Comp Neurol* **214**, 451–458.

- Kuo JJ, Siddique T, Fu R & Heckman CJ (2005). Increased persistent Na⁺ current and its effect on excitability in motoneurons cultured from mutant SOD1 mice. *J Physiol* **563**, 843–854.
- Kuo JJ, Lee RH, Zhang L & Heckman CJ (2006). Essential role of the persistent sodium current in spike initiation during slowly rising inputs in mouse spinal neurons. *J Physiol* **574**, 819–834.
- Lacomblez L, Bensimon G, Leigh PN, Guillet P, Powe L, Durrleman S, Delumeau JC & Meininger V (1996). A confirmatory dose-ranging study of riluzole in ALS. ALS/Riluzole Study Group-II. *Neurology* **47**, S242–S250.
- Lee RH & Heckman CJ (2001). Essential role of a fast persistent inward current in action potential initiation and control of rhythmic firing. *J Neurophysiol* **85**, 472–475.
- Manuel M & Heckman CJ (2011). Adult mouse motor units develop almost all of their force in the subprimary range: a new all-or-none strategy for force recruitment? *J Neurosci* **31**, 15188–15194.
- Manuel M & Heckman CJ (2012a). Simultaneous intracellular recording of a lumbar motoneuron and the force produced by its motor unit in the adult mouse in vivo. *J Vis Exp*, e4312.
- Manuel M & Heckman CJ (2012b). Single motor unit properties in SOD1 mice. In *Program No 15510 2012 Neuroscience Meeting Planner*. Society for Neuroscience, 2012. Online, New Orleans, LA.
- Manuel M, Iglesias C, Donnet M, Leroy F, Heckman CJ & Zytnicki D (2009). Fast kinetics, high-frequency oscillations, and subprimary firing range in adult mouse spinal motoneurons. *J Neurosci* **29**, 11246–11256.
- Manuel M, Li Y, Elbasouny SM, Murray K, Griener A, Heckman CJ & Bennett DJ (2012). NMDA induces persistent inward and outward currents that cause rhythmic bursting in adult rodent motoneurons. *J Neurophysiol* **108**, 2991–2998.
- Martin E, Cazenave W, Cattaert D & Branchereau P (2013). Embryonic alteration of motoneuronal morphology induces hyperexcitability in the mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* **54**, 116–126.
- McLarnon JG (1995). Potassium currents in motoneurons. *Prog Neurobiol* **47**, 513–531.
- Meehan CF, Moldovan M, Marklund SL, Graffmo KS, Nielsen JB & Hultborn H (2010). Intrinsic properties of lumbar motor neurones in the adult G127insTGGG superoxide dismutase-1 mutant mouse in vivo: evidence for increased persistent inward currents. *Acta Physiol (Oxf)* **200**, 361–376.
- Miles GB, Dai Y & Brownstone RM (2005). Mechanisms underlying the early phase of spike frequency adaptation in mouse spinal motoneurons. *J Physiol* **566**, 519–532.
- Murray KC, Nakae A, Stephens MJ, Rank M, D'Amico J, Harvey PJ, Li X, Harris RL, Ballou EW, Anelli R, Heckman CJ, Mashimo T, Vavrek R, Sanelli L, Gorassini MA, Bennett DJ & Fouad K (2010). Recovery of motoneuron and locomotor function after spinal cord injury depends on constitutive activity in 5-HT_{2C} receptors. *Nat Med* **16**, 694–700.
- Pambo-Pambo A, Durand J & Gueritaud JP (2009). Early excitability changes in lumbar motoneurons of transgenic SOD1G85R and SOD1G(93A-Low) mice. *J Neurophysiol* **102**, 3627–3642.
- Perrier JF, Rasmussen HB, Christensen RK & Petersen AV (2013). Modulation of the intrinsic properties of motoneurons by serotonin. *Curr Pharm Des* **19**, 4371–4384.
- Pieri M, Albo F, Gaetti C, Spalloni A, Bengtson CP, Longone P, Cavalcanti S & Zona C (2003). Altered excitability of motor neurons in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett* **351**, 153–156.
- Pun S, Santos AF, Saxena S, Xu L & Caroni P (2006). Selective vulnerability and pruning of phasic motoneuron axons in motoneuron disease alleviated by CNTF. *Nat Neurosci* **9**, 408–419.
- Quinlan KA, Schuster JE, Fu R, Siddique T & Heckman CJ (2011). Altered postnatal maturation of electrical properties in spinal motoneurons in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Physiol* **589**, 2245–2260.
- R Development Core Team (2010). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rao SD & Weiss JH (2004). Excitotoxic and oxidative cross-talk between motor neurons and glia in ALS pathogenesis. *Trends Neurosci* **27**, 17–23.
- Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng HX & et al. (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* **362**, 59–62.
- Rothstein JD, Tsai G, Kuncl RW, Clawson L, Cornblath DR, Drachman DB, Pestronk A, Stauch BL & Coyle JT (1990). Abnormal excitatory amino acid metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* **28**, 18–25.
- Sandyk R (2006). Serotonergic mechanisms in amyotrophic lateral sclerosis. *Int J Neurosci* **116**, 775–826.
- Sekerli M, Del Negro CA, Lee RH & Butera RJ (2004). Estimating action potential thresholds from neuronal time-series: new metrics and evaluation of methodologies. *IEEE Trans Biomed Eng* **51**, 1665–1672.
- Sunico CR, Dominguez G, Garcia-Verdugo JM, Osta R, Montero F & Moreno-Lopez B (2011). Reduction in the motoneuron inhibitory/excitatory synaptic ratio in an early-symptomatic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Pathol* **21**, 1–15.
- Van Den Bosch L (2011). Genetic rodent models of amyotrophic lateral sclerosis. *J Biomed Biotechnol* **2011**, 348765.
- van Zundert B, Peuscher MH, Hynynen M, Chen A, Neve RL, Brown RH, Jr, Constantine-Paton M & Bellingham MC (2008). Neonatal neuronal circuitry shows hyperexcitable disturbance in a mouse model of the adult-onset neurodegenerative disease amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* **28**, 10864–10874.
- von Lewinski F & Keller BU (2005). Ca²⁺, mitochondria and selective motoneuron vulnerability: implications for ALS. *Trends Neurosci* **28**, 494–500.
- Vucic S, Nicholson GA & Kiernan MC (2008). Cortical hyperexcitability may precede the onset of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* **131**, 1540–1550.
- Young S & Bowman A (1995). Non-parametric analysis of covariance. *Biometrics* **51**, 920–931.

Zengel JE, Reid SA, Sybert GW & Munson JB (1985).

Membrane electrical properties and prediction of motor-unit type of medial gastrocnemius motoneurons in the cat. *J Neurophysiol* **53**, 1323–1344.

Zona C, Pieri M & Carunchio I (2006). Voltage-dependent sodium channels in spinal cord motor neurons display rapid recovery from fast inactivation in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurophysiol* **96**, 3314–3322.

Additional information

Competing interests

The authors declare no competing financial interests.

Author contributions

N.D., M.M., C.I. and D.Z. performed the *in vivo* experiments. M.M. and S.M.E. performed the *in vitro* experiments. N.D., M.M. and D.Z. analysed the data. N.D, M.M., C.J.H. and D.Z. wrote the article. All authors approved the final version of the manuscript.

Funding

Financial supports provided by AFM (MNM2 2009 Grant 14229), ARS-SLA (Grant LS_051481), ANR 'Hyper-MND'

(ANR-2010-BLAN-1429-01), NIH-NINDS (R01NS077863), Thierry Latran Foundation (OHEX Project), and Target-ALS are gratefully acknowledged. N.D. was supported by a Contrat Doctoral Université Paris Descartes; M.M. was supported by the Foundation pour la Recherche Médicale and the Milton Safenowitz Post Doctoral Fellowship for ALS Research (ALS Association); C.I. was supported by the Association Française contre les Myopathies; and S.M.E. was supported by the Tim E. Noel fellowship from the ALS Society of Canada.

Acknowledgements

The authors wish to thank Drs Jack Miller and Dave Bennett for technical assistance with the *in vitro* recordings, Ms Audrey Goulian for the genotyping of mice, Dr Sylvain Hannequin for his help with the statistical analysis and Dr Bradon Stell for his careful proofreading of the manuscript.

Author's present address

Sherif M. Elbasiouny: Department of Neuroscience, Cell Biology, and Physiology, Boonshoft School of Medicine, Wright State University, Dayton, OH 45435, USA.

Chapitre V - Vacuolisation de l'arborisation dendritique et couverture synaptique dans le modèle SOD1-G93A

Introduction

L'apparition de vacuoles dans la corne ventrale de la moelle épinière est une caractéristique pathologique majeure retrouvée à la fois dans les analyses post-mortem chez les patients SLA (Hirano et al. 1984; Menzies et al. 2002) et dans les modèles SOD1-G93A à partir de la 10^{ème} semaine (Gurney et al. 1994) et SOD1-G37R à partir de la 20^{ème} semaine (Wong et al. 1995). Les mécanismes de formation de ces vacuoles dans la pathologie ne sont pas totalement connus, cependant plusieurs études ont montré dans le modèle SOD1-G93A que ces vacuoles étaient d'origine mitochondriale (Kong & Xu 1998; Jaarsma et al. 2000) et se formaient par dilatation de leur espace inter-membranaire (Higgins et al. 2003). La translocation de la protéine SOD1 mutée du cytoplasme vers l'espace inter-membranaire mitochondrial et l'accumulation de la protéine dans les mitochondries semblent être associées au début de la vacuolisation (Jaarsma et al. 2001). L'accumulation d'agents oxydants ou de calcium dans la matrice mitochondriale pourrait également être impliquée dans la formation des vacuoles via l'activation des pores mitochondriaux (mPTP) entraînant une entrée d'eau dans la mitochondrie par osmolarité, accompagnée d'une dépolarisation de la membrane mitochondriale (Bendotti et al. 2001; Halestrap et al. 2002). Si cette vacuolisation mitochondriale est liée à la survie des motoneurones dans la SLA, elle devrait progresser avec la pathologie et toucher dans une plus grande mesure les motoneurones les plus vulnérables.

L'absence d'hyperexcitabilité intrinsèque des motoneurones dans le modèle SOD1-G93A *high* démontrée dans le chapitre précédent n'exclut pas qu'une augmentation de l'excitabilité d'origine extrinsèque se mette en place au cours de la progression de la pathologie. Elle pourrait aussi bien résulter d'une augmentation de l'activité synaptique excitatrice que d'une diminution de l'inhibition synaptique, ou encore d'une combinaison de ces deux mécanismes. Une excitabilité extrinsèque ainsi accrue provoquerait une entrée de calcium supplémentaire, susceptible de provoquer la vacuolisation des mitochondries.

En ce sens, plusieurs études ont rapporté des modifications de la couverture synaptique sur les motoneurones SOD1. Toutefois, les conclusions de ces études divergent. Shutz et al. (2005) rapportent une diminution de l'innervation glutamatergique des motoneurones, à partir de P110, sans changement de l'innervation inhibitrice, alors que Sunico et al. (2011) montrent une diminution de la couverture synaptique des motoneurones, à partir de P90, résultant d'une large perte des synapses inhibitrices légèrement compensée par une augmentation des synapses excitatrices (Schütz 2005; Sunico et al. 2011). Si une modification de l'activité synaptique est responsable de la vacuolisation des mitochondries, celle-ci devrait être plus prononcée dans les régions dendritiques où la densité synaptique est la plus élevée.

Dans cette étude, nous avons réalisé des marquages intracellulaires de motoneurones de souris SOD1-G93A, dans une gamme d'âges allant du stade pré-symptomatique jusqu'au stade terminal de la maladie, afin de déterminer si la vacuolisation dendritique était corrélée à la progression de la pathologie et à la vulnérabilité des motoneurones. Nous avons aussi étudié la couverture synaptique inhibitrice et excitatrice de ces motoneurone pour vérifier si elle pouvait être mise en relation avec l'émergence de ces vacuoles.

Méthodes

Animaux et préparation

Pour les besoins de l'étude, nous avons utilisé des souris sauvages (WT) et SOD1-G93A^{high} (SOD1) de fond génétique CD1, B6 et B6/SJL, élevées au laboratoire, ainsi que des souris B6 exprimant le gène SOD1 humain non muté (SOD1WT) provenant du laboratoire de S. Boilée. La procédure chirurgicale est adaptée de celle utilisée dans les articles précédents (Iglesias et al. 2011, [Article 2](#) cf. Méthodes). La souris était anesthésiée au pentobarbital sodique et mise sous respiration artificielle. Un cathéter était introduit dans la jugulaire pour administrer l'anesthésique de manière régulière. Le nerf sciatique était exposé et disséqué pour ne conserver que la branche innervant le triceps

sural en continuité avec le muscle. Finalement, une laminectomie était effectuée sur les segments vertébraux Th13 et L1.

Électrophysiologie

Les motoneurones du triceps *surae* étaient empalés par une microélectrode (KCL 3M + Neurobiotine 2 %) d'un diamètre à la pointe compris entre 1 et 1,5µm et de résistance 5-10MΩ. Ils étaient identifiés par enregistrement d'un potentiel d'action antidromique lors de la stimulation du nerf du triceps *surae*. Leurs propriétés électrophysiologiques (résistance d'entrée, temps de conduction antidromique) étaient mesurées en courant imposé et la vitesse de conduction axonale estimée par le rapport entre le temps de conduction antidromique et la longueur du nerf (mesurée précisément à la fin de l'expérience entre le point de stimulation du nerf et le point d'entrée de la microélectrode dans la moelle épinière). L'état fonctionnel des jonctions neuromusculaires était également estimé, lors de la stimulation intracellulaire du motoneurone, par l'enregistrement d'un EMG dans le triceps *surae*.

Marquage intracellulaires et reconstruction 3D

Dans chaque expérience, un motoneurone unique du triceps *surae* était marqué de façon intracellulaire par injection de Neurobiotine (Vector labs) via l'électrode d'enregistrement. La molécule étant chargée, un train de créniaux dépolarisant (3-10nA, 500ms) à 1Hz était appliqué au motoneurone pour permettre son transfert dans le milieu intracellulaire. Après retrait de l'électrode, le nerf du triceps *surae* était stimulé à 1Hz pendant 1h pour faciliter la diffusion de la Neurobiotine dans le motoneurone. La souris était ensuite perfusée de manière intracardiaque avec 20mL de PBS et 100mL de paraformaldehyde 4 %, puis la moelle épinière était prélevée et sectionnée au vibratome (VT1000S, Leica GmbH, Wetzlar, Allemagne) en tranches de 60µm. Les tranches étaient incubées pendant 1h dans une solution de blocage/perméabilisation (tampon phosphate salin (PBS) ; albumine de sérum bovin (BSA) 0,1% ; TritonX100 1%) et la Neurobiotine était ensuite révélée par incubation pendant 2h dans une solution de PBS contenant de la Streptavidine conjuguée au fluorophore Cyanine3 à la concentration 1/500 (Sigma-Aldrich). Les tranches étaient finalement montées après rinçage au PBS entre lames et

lamelles dans un milieu de montage neutre (Fluoromount ; Sigma-Aldrich). L'acquisition des piles d'images était réalisée sur les tranches sériées avec un microscope confocal (LSM710; Carl Zeis, Oberkochen, Allemagne) et le motoneurone reconstruit en trois dimensions à l'aide du logiciel Neurolucida (MBF Biosciences, Williston VT, USA).

Immunohistochimie

Nous avons révélé les contacts synaptiques inhibiteurs et excitateurs par immunohistochimie. Après révélation de la Neurobiotine, les tranches étaient incubées pendant 15 minutes dans une solution de blocage (PBS, BSA 0,1% Sérum d'âne 10%) puis pendant une nuit dans une solution de PBS contenant les anticorps primaires de lapin anti-VGAT (Vesicular GABA Transporter (Synaptic Systems) 1/500) et de cochon d'Inde anti-VGLUT1 (Vesicular Glutamate Transporter 1 (Merck Millipore) 1/4000) ou anti-VGLUT2 (Vesicular Glutamate Transporter 2 (Merck Millipore) 1/500). Le lendemain les anticorps primaires étaient révélés, après rinçage au PBS, par incubation pendant deux heures dans une solution de PBS contenant les anticorps secondaires d'âne anti-lapin couplés à l'Alexa488 (Jackson ImmunoResearch Laboratories ; 1/500) et anti-cochon d'Inde couplé à l'Alexa 647 (Jackson ImmunoResearch Laboratories ; 1/500). Les tranches étaient ensuite montées et observées en microscopie confocale comme indiqué précédemment.

Analyse

Pour chaque motoneurone marqué à la Neurobiotine, une longueur dendritique comprise entre 600 et 3300µm et contenant les plus grosses varicosités a été analysée sous Neurolucida Explorer (MBF Biosciences, Williston VT, USA). La longueur et le diamètre de chaque varicosité ainsi que leur densité sur l'échantillon dendritique considéré ont été mesurés. La présence ou non de vacuoles dans ces varicosités a également été vérifiée pour chacune d'entre elles : une varicosité contenant une zone interne non occupée par la Neurobiotine (non fluorescente) a été comptée comme vacuolisée (la Neurobiotine ne pénètre pas à l'intérieur de la vacuole). Pour l'un des motoneurones SOD1, l'arborisation a été reconstruite dans son intégralité et la position de chaque varicosité dendritique reportée en fonction de sa distance radiale au soma. Les

micrographies (photographies réalisées en microscopie) des marquages immunohistochimiques ont été traitées et analysées sous ImageJ afin de mesurer les densités des contacts synaptiques apposés au motoneurone marqué à la Neurobiotine. L'analyse des données électrophysiologiques a été réalisée sous Spike2 (CED, Cambridge, R-U). La résistance d'entrée des motoneurones a été mesurée par la pente de la courbe courant-voltage en réponse à l'injection de créneaux de courant hyperpolarisants et dépolarisants, comme indiqué précédemment (cf. Chapitre IV, Méthodes).

Les analyses statistiques ont été réalisées via les logiciels KaleidaGraph et R. Les données ont été exprimées en moyenne \pm écart-type. Les distributions des paramètres mesurés ne suivant pas une distribution normale (test de Kolmogorov-Smirnov), nous avons utilisé le test non paramétrique de Wilcoxon-Mann-Whitney (WMW) pour comparer les moyennes (avec un seuil de significativité fixé à 0,05). Puisque la maladie progresse pendant la période de temps exploré, le lien entre ces paramètres et l'âge des animaux a été vérifié par le coefficient de corrélation de Bravais-Pearson (r ; avec un seuil de significativité fixé à 0,05).

Résultats

Les motoneurones SOD1 présentent des varicosités dendritiques vacuolisées de taille anormalement importante

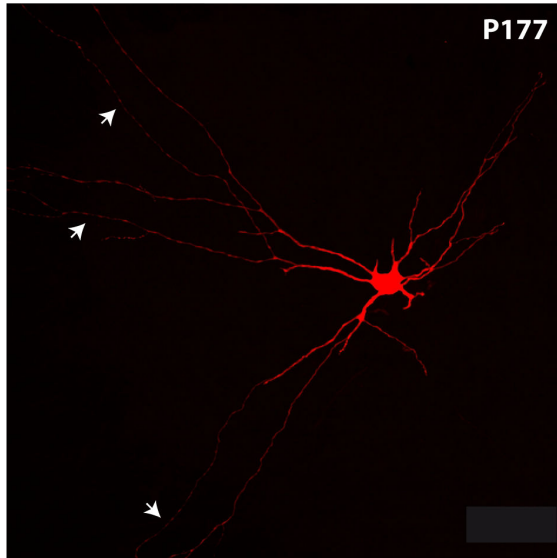
Nos marquages intracellulaires ont révélé que les motoneurones WT [$n=9$, $P72\pm43$ (P42-P177)] de souris possédaient des varicosités (dilatations ponctuelles de la membrane) de petite taille réparties le long de leur arborisation dendritique (illustré à P177 sur la [Figure 13A](#) par les flèches). Quelques unes d'entre elles contenaient une vacuole de petite taille ([Figure 13A](#), micrographie du bas, astérisques et encart de droite). Les motoneurones SOD1 [$n=13$, $P72\pm24$ (P43-P110)] exprimaient également ces varicosités dendritiques (illustré à P110 sur la [Figure 13B](#) par les flèches) mais la plupart d'entre elles étaient occupées par une ou plusieurs larges vacuoles et pouvaient atteindre des tailles anormalement importantes. Les motoneurones SOD1WT [$n=5$, $P104\pm44$ (P72-P179)]

avaient quant à eux une morphologie similaire à celle des motoneurones WT, avec de petites varicosités (indiquées à P179 sur la [Figure 13C](#) par les flèches) peu vacuolisées (quelques vacuoles sont indiquées sur la micrographie du bas par les astérisques).

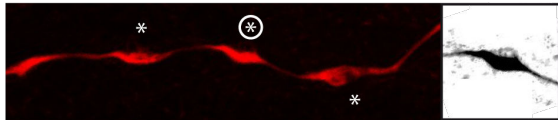
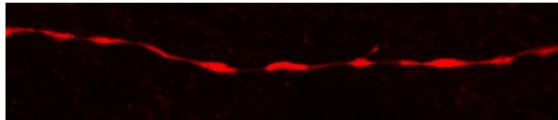
Malgré ses larges varicosités dendritiques vacuolisées, le motoneurone SOD1 illustré [Figure 13B](#) était toujours capable de produire un EMG lors de leur stimulation intracellulaire ([Figure 13D](#)). Ceci indique que l'émergence de vacuoles de grande taille dans les motoneurones SOD1 précède la dénervation de leurs jonctions neuromusculaires.

Figure 13 : Varicosités dendritiques des motoneurones et vacuolisation. A. Micrographies d'un motoneurone de souris WT âgée de 177 jours. La micrographie du haut montre une vue d'ensemble du soma et de l'arborisation dendritique comprise dans une tranche de 60µm d'épaisseur. Les deux micrographies du bas montrent deux segments dendritiques observés à plus gros grossissement et présentant plusieurs varicosités de petit diamètre. Les astérisques indiquent de petites vacuoles parfois observées dans quelques varicosités. L'encart de droite est une image en noir et blanc de la varicosité correspondante à l'étoile cerclée, sur laquelle la vacuole est bien visible B. Micrographies d'un motoneurone de souris SOD1-G93A âgée de 110 jours. Même organisation qu'en A. Notez la grande taille des varicosités (>15µm de diamètre), toutes occupées par une ou plusieurs larges vacuoles. C. Micrographies d'un motoneurone de souris SOD1WT âgée de 179 jours. Même organisation qu'en A. Les varicosités arborent ici un phénotype similaire à celles du motoneurone WT en A : Elles sont de petit diamètre et présentent parfois des vacuoles de petite taille (indiquées par les astérisques sur la micrographie du bas). D. tracé électromyographique (trace rouge) enregistré dans le triceps *surae* lors de la stimulation intracellulaire (trace noire) du motoneurone illustré en B. Notez l'aspect polyphasique du signal EMG, suggérant une désynchronisation de branches intramusculaires de l'axone du motoneurone. La trace verte correspond au potentiel membranaire sur lequel on peut voir le potentiel d'action émis par le motoneurone (flèche), en partie masqué par l'artefact de stimulation.

A WT

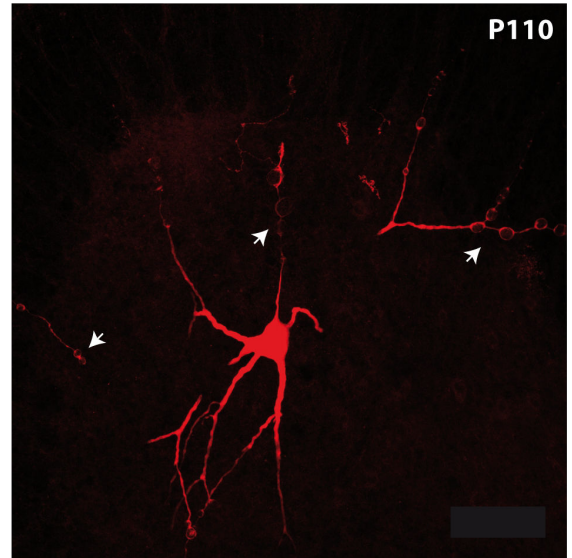


100 μm

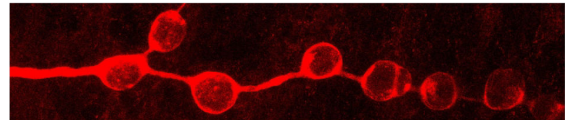
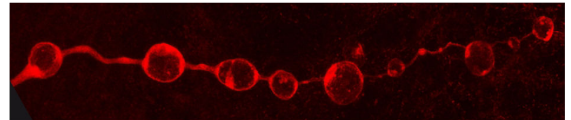


10 μm

B SOD1

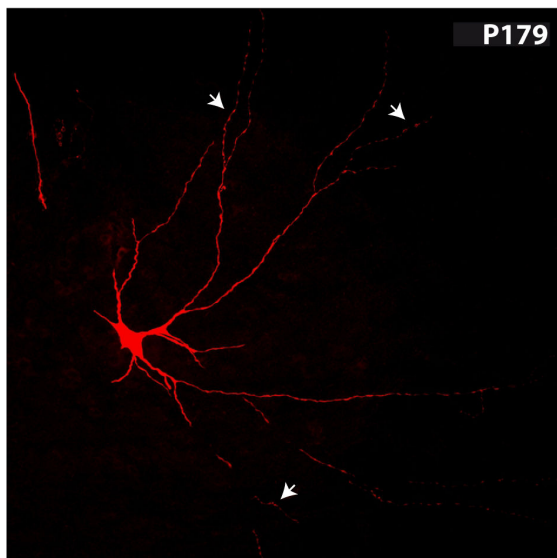


100 μm

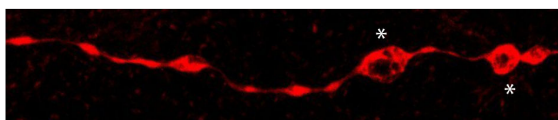
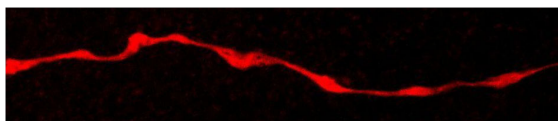


25 μm

C SOD1WT

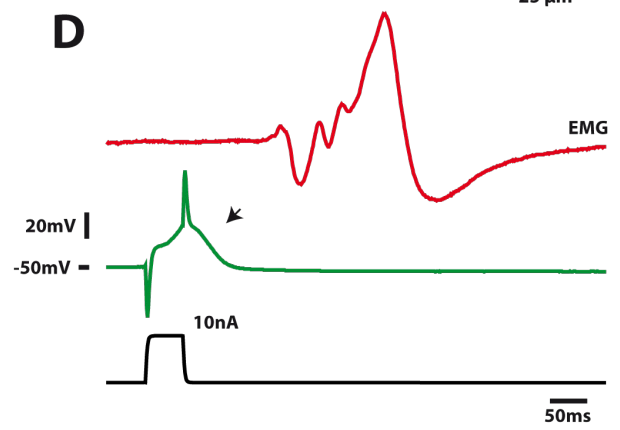


100 μm



10 μm

D



Le diamètre des varicosités dendritiques augmente avec l'âge dans les motoneurones SOD1

Dans l'ensemble de notre échantillon, les diamètres des varicosités dendritiques des motoneurones SOD1 [$3,0 \pm 2,0 \mu\text{m}$ ($1,3-8,8 \mu\text{m}$) $n=13$] était en moyenne plus important que ceux des varicosités des motoneurones WT [$1,6 \pm 0,3 \mu\text{m}$ ($1,1-2,1 \mu\text{m}$) $n=9$; WMW $p<0,001$] et SOD1WT [$1,7 \pm 0,5 \mu\text{m}$ ($0,9-2,2 \mu\text{m}$) $n=5$; WMW $p=0,03$]. Pour les animaux les plus jeunes ($<P60$), la différence de diamètre était peu marquée entre les varicosités SOD1 [$2,0 \pm 0,5 \mu\text{m}$ ($1,3-2,6 \mu\text{m}$) $n=6$] et WT [$1,5 \pm 0,4 \mu\text{m}$ ($1,1-2,1 \mu\text{m}$) $n=6$; WMW $p=0,04$] mais les diamètres des varicosités SOD1 augmentaient avec l'âge des souris ([Figure 14A et B](#)) entre P43 et P110 [$r=0,68$ $n=13$ $p=0,01$] alors qu'ils restaient constant pour les motoneurones WT entre P42 et P177 [$r=0,18$ $n=9$ $p=0,6$] ([Figure 14B](#)) et SOD1WT entre P72 et P179 [$r=0,12$ $n=5$ $p=0,8$]. Ainsi le diamètre maximal des varicosités du motoneurone SOD1 illustré [Figure 13B](#) et [14A](#) pouvait par exemple dépasser $16 \mu\text{m}$ à P110 alors que les varicosités du motoneurones WT illustré par la [Figure 13A](#) n'atteignaient qu'un diamètre maximal de $4 \mu\text{m}$ à P177. De même, les varicosités SOD1WT ne dépassaient pas $5 \mu\text{m}$ de diamètre à P179 ([Figure 13C](#)). Des varicosités non vacuolisées de petites tailles subsistaient cependant, même dans les motoneurones des souris SOD1 les plus âgées (illustré à P110 sur la [Figure 14A](#), micrographie de droite) indiquant que toutes les varicosités ne voyaient pas leur taille augmenter de la même façon.

Bien que certaines varicosités WT et SOD1WT contenaient de petites vacuoles, le pourcentage de varicosités vacuolisées était significativement plus important dans les motoneurones SOD1 [$68 \pm 20\%$ ($36-98\%$) $n=13$] que dans les motoneurones WT [$9 \pm 11\%$ ($0-30\%$) $n=9$; WMW $p=0,0001$] ou SOD1WT [$32 \pm 25\%$ ($15-76\%$) $n=5$; WMW $p=0,02$]. La forte vacuolisation des varicosités SOD1 était présente dès P40 sur notre échantillon ([Figure 14C](#)) et n'augmentait pas de manière significative avec l'âge [$r=0,25$ $n=13$ $p=0,4$]. Elle augmentait cependant significativement dans les varicosités WT [$r=0,85$ $n=9$ $p=0,004$] ([Figure 14C](#)) et SOD1WT [$r=0,98$ $n=5$ $p=0,003$]. Ceci suggère que la vacuolisation excessive des motoneurones SOD1 apparaît précocement dans la maladie mais que l'augmentation de la taille des vacuoles est un phénomène plus tardif.

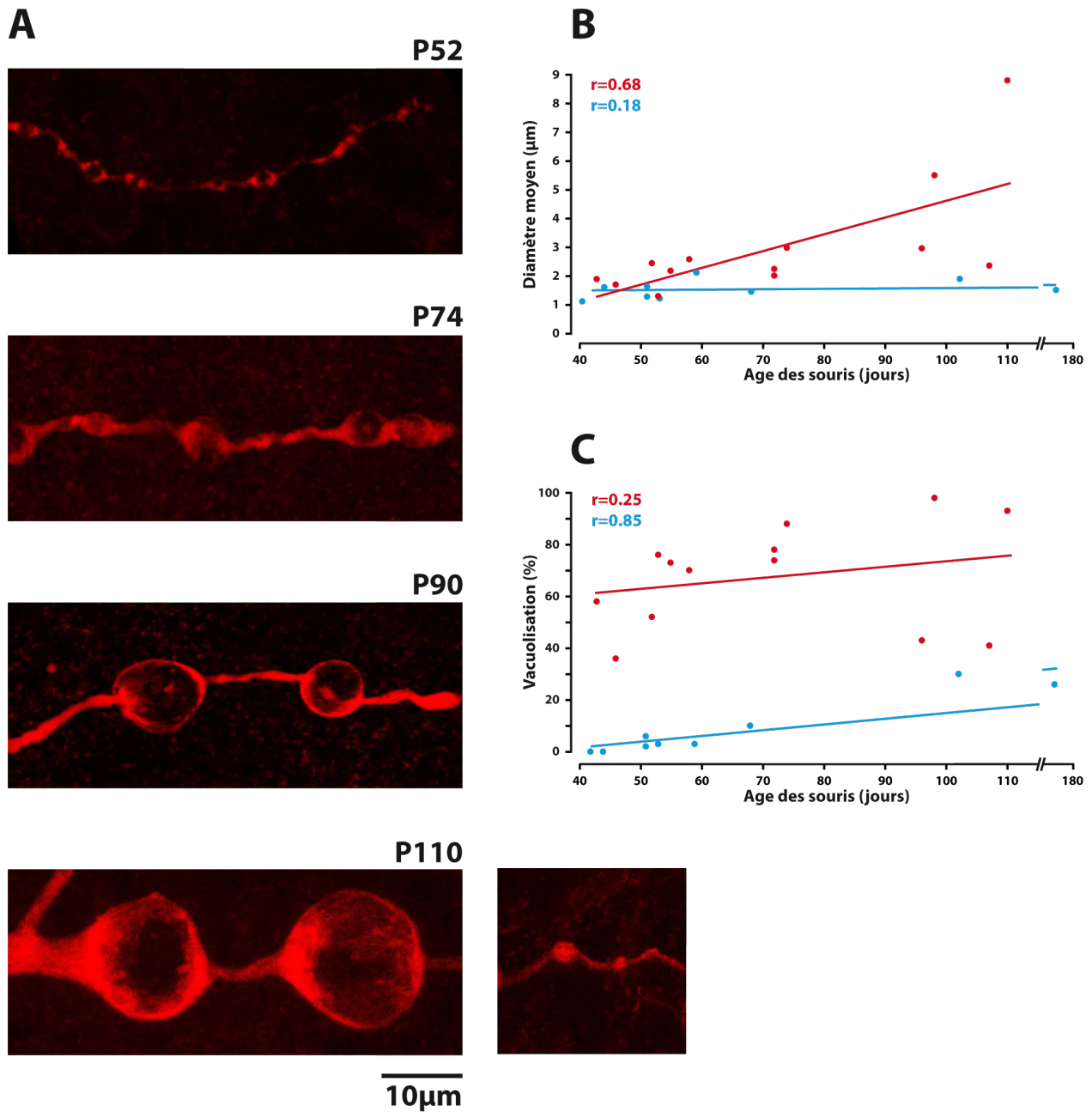


Figure 14 : Augmentation de la taille des varicosités SOD1 avec la progression de la maladie. A. Micrographies de varicosités de motoneurones de souris SOD1 d'âges différents. Le diamètre des varicosités augmente avec l'âge des souris pour passer de 2µm pour le motoneurone de souris de 52 jours à plus de 16µm pour celui de la souris de 110 jours. La micrographie de droite à P110 illustre des varicosités non vacuolisées et de petite taille toujours présentes à cette âge. B. Diamètre moyen des varicosités de chaque motoneurone WT (points bleus) et SOD1 (points rouges) en fonction de l'âge. Les droites de régression et leurs coefficients sont représentés pour les valeurs WT (bleu) et SOD1 (rouge). Le diamètre moyen des varicosités augmentait fortement avec l'âge pour les motoneurones SOD1 alors qu'il restait constant pour les motoneurones WT. C. Taux de vacuolisation des varicosités de chaque motoneurone WT (points bleus) et SOD1 (points rouges) en fonction de l'âge. Les droites de régression et leurs coefficients sont représentés pour les valeurs WT (bleu) et SOD1 (rouge). Le diamètre moyen des varicosités restait relativement constant sur la gamme d'âge explorée pour les motoneurones SOD1 et WT.

Les varicosités des motoneurones SOD1 commencent à grossir distalement

La densité moyenne des varicosités (qu'elles soient vacuolisées ou non) était la même sur les motoneurones de souris SOD1 et sur les motoneurones de souris WT [Figure 12 E; SOD1 $73 \pm 26 \text{ var./mm}$ (33-131 var./mm) $n=13$; WT $75 \pm 30 \text{ var./mm}$ (43-119 var./mm) $n=9$; WMW $p=0,84$]. Elle était également constante dans la gamme d'âge explorée pour les motoneurones SOD1 [$r=0,10$ $n=13$ $p=0,8$] et WT [$r=0,21$ $n=9$ $p=0,6$]. Cela suggère que les vacuoles des motoneurones SOD1 émergent et grossissent au sein de varicosités pré-existantes.

La densité des varicosités n'était cependant pas constante le long l'arborisation dendritique des motoneurones. Que ce soit pour les motoneurones WT ou SOD1, les varicosités étaient moins nombreuses sur les dendrites les plus proximales et leur densité augmentait en s'éloignant du soma, jusqu'à atteindre un plateau sur les segments dendritiques distaux (illustré pour un motoneurone SOD1 à P64 par les Figures 15A, B et C).

L'augmentation de la taille de ces varicosités dans les motoneurones SOD1 n'était pas uniforme non plus sur l'arborisation dendritique. Les vacuoles commençaient à grossir dans les varicosités situées sur les parties distales de l'arborisation dendritique : La Figure 15D montre un motoneurone SOD1 à P59 sur lequel les varicosités sont de petite taille sur les dendrites proximales (micrographie du haut, flèches) alors que leur diamètre est plus important sur les dendrites distales (micrographies du bas). A des âges plus avancés, l'augmentation de la taille des varicosités touchait des dendrites plus proximales (Figure 15E à P107, flèches) jusqu'à affecter les varicosités présentes sur les dendrites primaires pour les animaux les plus âgés de notre échantillon (Figure 13B à P110, flèches).

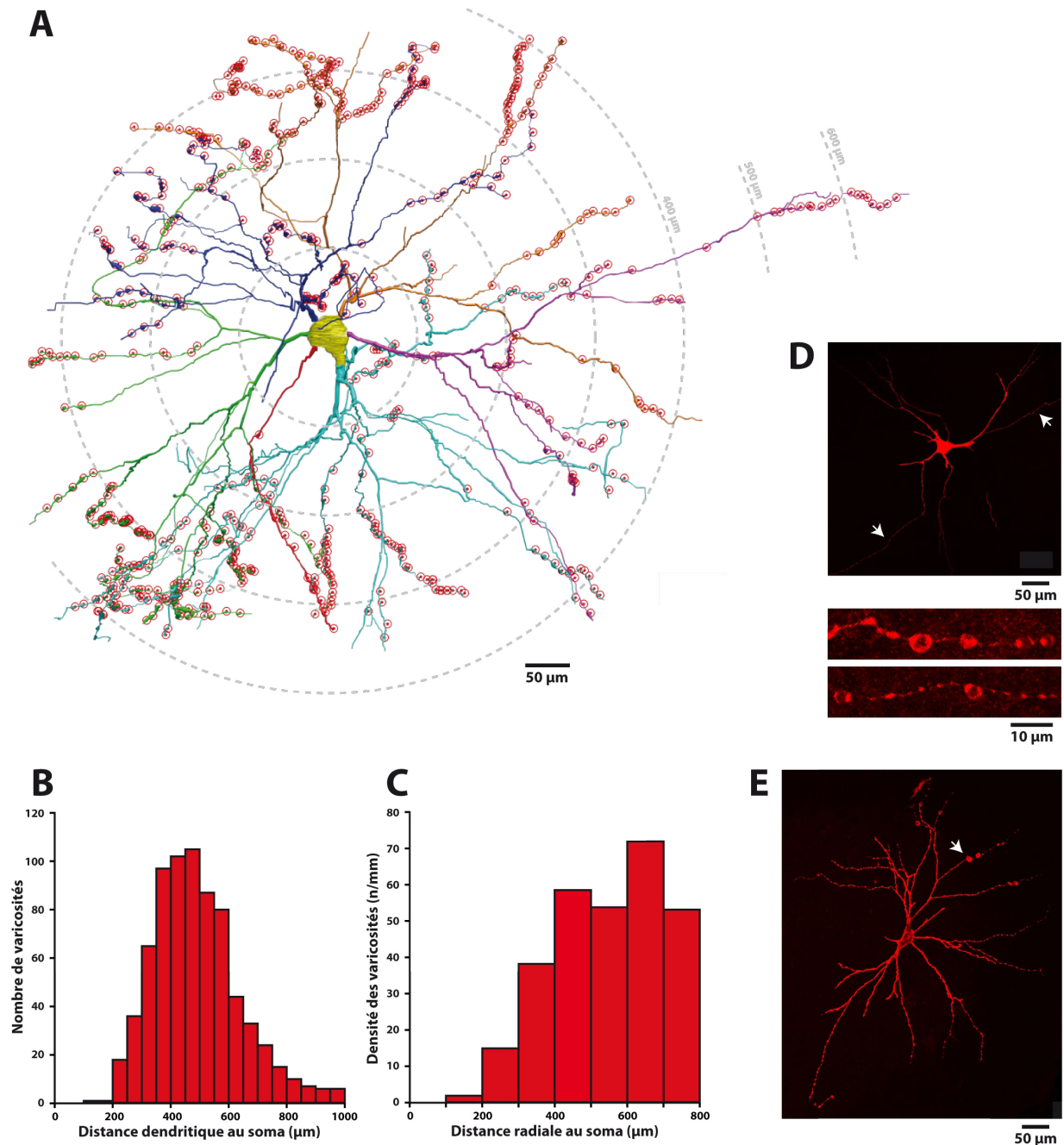


Figure 15: Répartition des varicosités sur l'arborisation dendritique des motoneurones et vacuolisation. A. Projection de la reconstruction en 3D d'un motoneurone de souris SOD1 âgé de 64 jours. Chaque couleur correspond à un arbre dendritique différent. Les symboles rouges indiquent la position des varicosités le long des dendrites. Notez leur forte concentration sur les segments dendritiques les plus distaux. Les cercles concentriques indiquent les distances radiales depuis le soma dans le plan passant en son centre. B. Distribution des varicosités en fonction de leur distance dendritique au soma. Notez que qu'elles sont quasi inexistantes sur les 200 premiers μm des dendrites. La diminution de leur nombre à partir de 500μm est due aux terminaisons dendritiques (cf. Figure 2). C. Densité des varicosités en fonction de la distance radiale au soma illustrée en A. D. Micrographies d'un motoneurone de souris SOD1 âgée de 59 jours. La micrographie du haut montre une vue d'ensemble du soma et des dendrites proximales comprises dans une tranche de 60μm d'épaisseur. Dans ce champ, les varicosités (dont certaines sont indiquées par les flèches) restent de taille comparable à celles des motoneurones WT. Les deux micrographies du bas montrent deux segments dendritiques distaux observés à plus gros grossissement et présentant plusieurs varicosités de diamètre moyen. E. Micrographie d'un motoneurone de souris SOD1 plus âgée (107 jours). La flèche blanche indique des varicosités de gros diamètre sur une dendrite proximale.

La vacuolisation dendritique progresse plus rapidement dans les motoneurones F que dans les S

Le diamètre moyen des varicosités était très variable dans les motoneurones SOD1 des souris les plus âgées ([Figure 14B](#), 2,4µm à P107 contre 8,8µm à P110). Afin de déterminer si l'augmentation de la taille des varicosités affectait différemment les motoneurones SOD1 selon leur vulnérabilité à la maladie (i.e. leur type physiologique), nous avons formé deux classes de motoneurones présentant des caractéristiques électrophysiologiques attribuables aux motoneurones *Fast* (vulnérables) ou *Slow* (résistants). Le premier groupe comportait 4 motoneurones présumés *Fast* ayant une vitesse de conduction axonale supérieure à 45m/s et une résistance d'entrée inférieure à 2,5MΩ. Le second regroupait 4 motoneurones présumés *Slow* dont la vitesse de conduction axonale était inférieure à 40m/s et la résistance d'entrée supérieure à 4MΩ ([Figure 16A](#)). Puisque la taille des varicosités des motoneurones SOD1 augmente avec l'âge des souris, nous nous sommes attachés à sélectionner des motoneurones d'âges distribués de la même façon dans les deux groupes (*Fast* P53-P110 ; *Slow* P55-P107 Test de Kolmogorov-Smirnov $p=1$) pour former 4 paires *Fast-Slow* d'âges équivalents. La distribution des diamètres des varicosités a montré qu'à âge équivalent, les varicosités de gros diamètres étaient plus nombreuses dans les motoneurones présumés *Fast* que dans les *Slow* ([Figure 16B](#)) suggérant que les vacuoles y grossissent plus rapidement.

De manière intéressante, la densité des varicosités des motoneurones *Fast* diminuait avec l'âge proportionnellement à l'augmentation de leur longueur (mesurée dans l'axe des dendrites, [Figure 16C](#)). Ceci pourrait s'expliquer par une fusion des varicosités : les varicosités des motoneurones *Fast* atteignant des tailles élevées en plus grande proportion, elles avaient probablement une plus grande tendance à fusionner entre elles au fur et à mesure que leur diamètre et leur longueur augmentaient, expliquant ainsi la diminution de leur densité. A l'appui de cette hypothèse, nous avons observé des varicosités de grande taille contenant plusieurs vacuoles dans les motoneurones de souris SOD1 les plus âgées ([Figure 16D](#)).

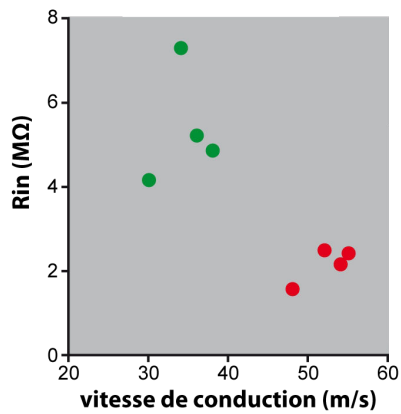
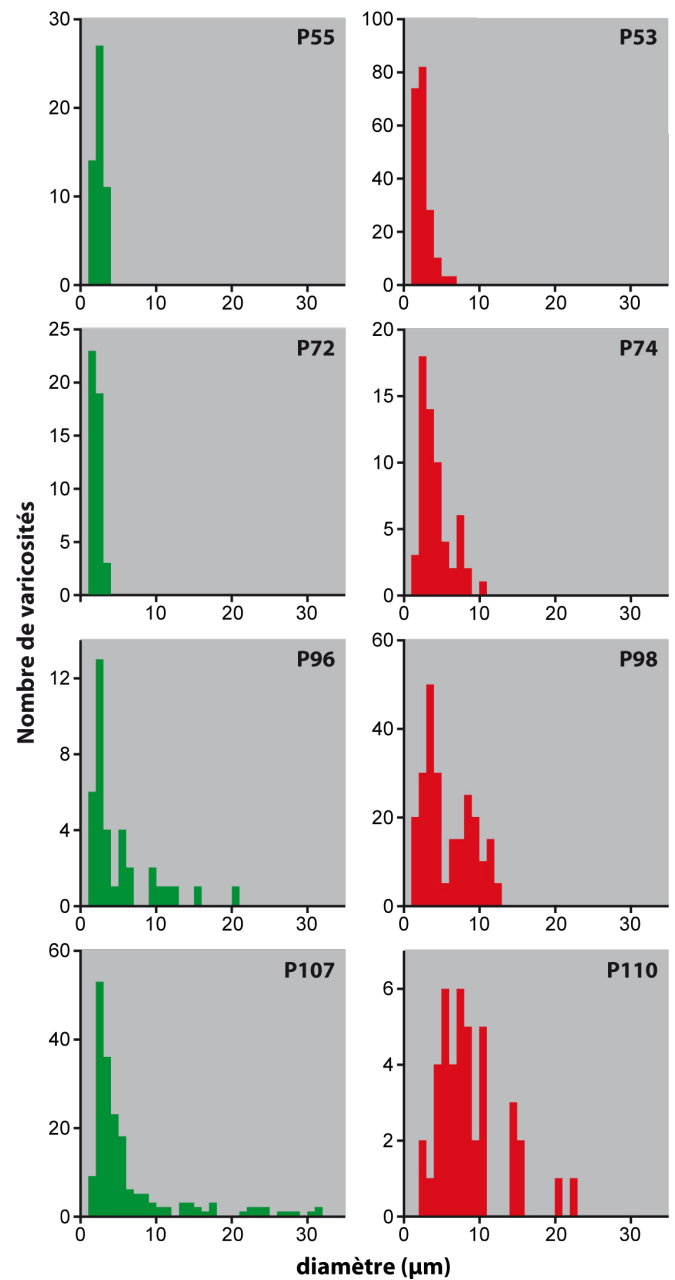
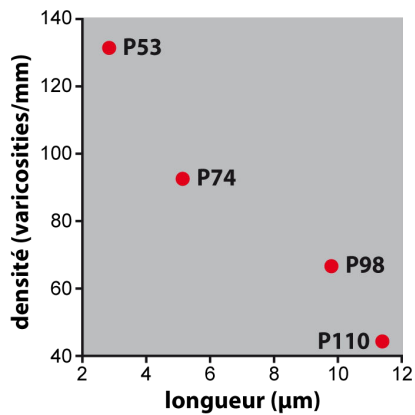
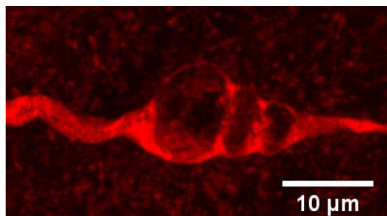
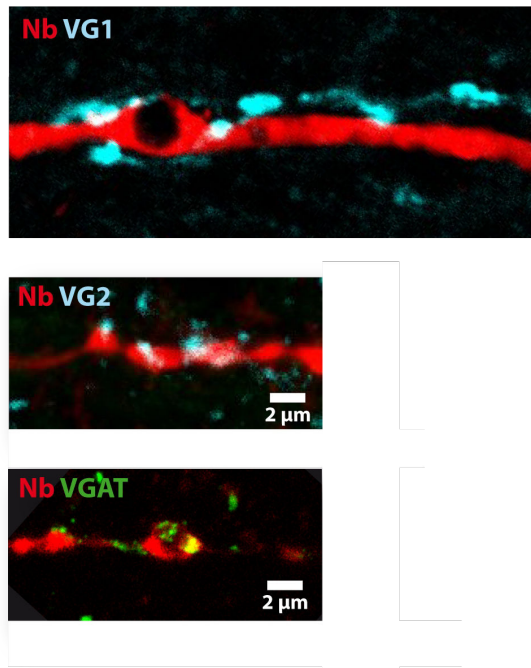
A**B****C****D**

Figure 16 : Progression différentielle de la taille des varicosités entre motoneurones *Fast* et *Slow*. A. Résistance d'entrée des motoneurones en fonction de leur vitesse de conduction. Les motoneurones que nous avons considérés comme *Fast* correspondent aux points rouges, ceux que nous avons considéré comme *Slow* aux points verts. B. distribution du diamètre des varicosité pour chaque motoneurones *Fast* (rouge) et *Slow* (vert). Les âges sont indiqués pour chaque motoneurone. C. Densité des varicosités en fonction de leur longueur moyenne pour les motoneurones *Fast*. Les âges sont indiqués pour chaque point. D. Micrographie de varicosités d'une portion dendritique d'un motoneurone SOD1 comportant plusieurs vacuoles.

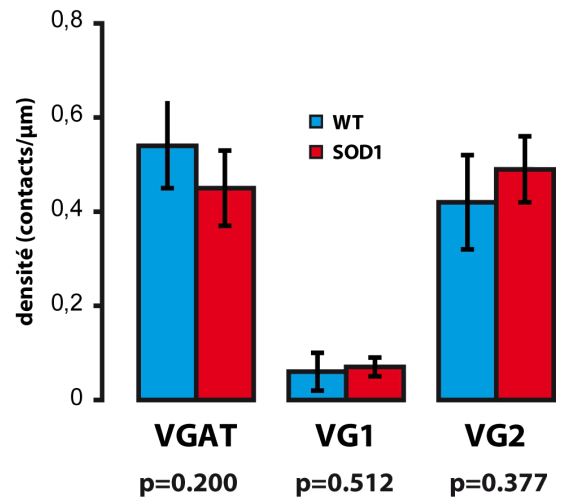
Les synapses se concentrent sur les varicosités

Afin de déterminer si la vacuolisation excessive des motoneurones SOD1 était liée à une modification de la couverture synaptique des motoneurones dans la SLA, nous avons mesuré les densités de contacts synaptiques GABAergiques (VGAT) et glutamatergiques de type 1 (VGLUT1) et 2 (VGLUT2) sur les motoneurones SOD1 et WT (Figure 17A) aux alentours de 50 jours [SOD1 52±6jours (43-58jours) n=6 ; WT 50±6jours (42-59jours) n=6 ; WMW p=0,57]. Les densités synaptiques étaient similaires entre les motoneurones SOD1 et WT (Figure 17B) pour les contacts VGAT (SOD1 453±88contacts/mm, n=6 ; WT 544±94contacts/mm, n=5 WMW p=0,2), VGLUT1 (SOD1 67±14contacts/mm, n=6 ; WT 60±39contacts/mm, n=6 WMW p=0,39) et VGLUT2 (SOD1 491±70contacts/mm, n=6 ; WT 423±94contacts/mm, n=6 WMW p=0,26). Cependant, les densités synaptiques VGAT et VGLUT2 étaient plus importantes sur les varicosités que sur les segments dendritiques en dehors des varicosités à la fois pour les motoneurones SOD1 (Figure 17C ; VGAT 765±175contacts/mm sur varicosités ; 371±95contacts/mm hors varicosités, n=6 WMW p=0,002) (VGLUT2 771±148contacts/mm sur varicosités ; 360±78contacts/mm hors varicosités, n=6 WMW p=0,002) et WT (Figure 17D ; VGAT 874±145contacts/mm sur varicosités ; 419±106contacts/mm hors varicosités, n=5 WMW p=0,008) (VGLUT2 733±209contacts/mm sur varicosités ; 328±95contacts/mm hors varicosités, n=6 WMW p=0,002).

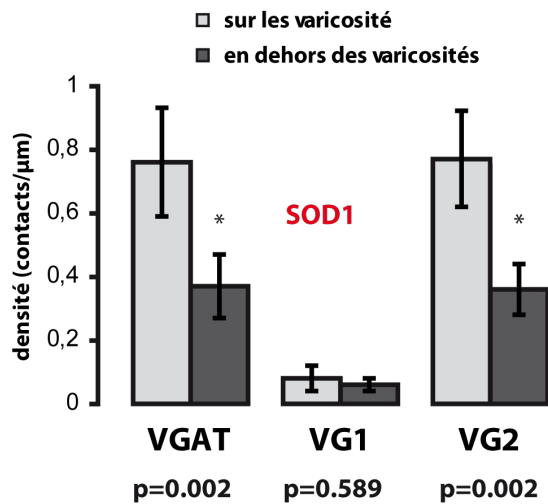
A



B



C



D

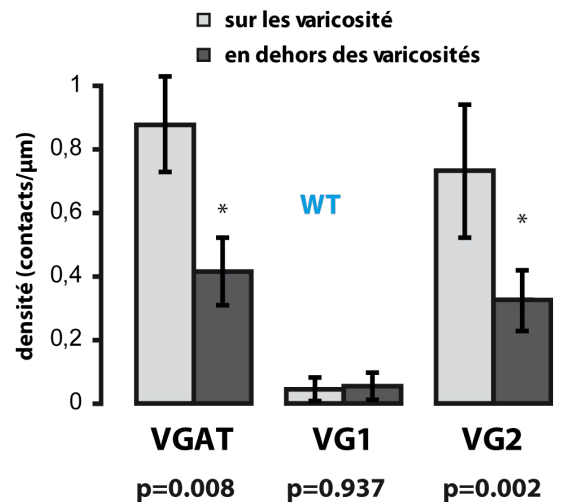


Figure 17 : Répartition des contacts synaptiques sur l'arborisation dendritique des motoneurones. A. Marquages immunohistochimiques des contacts synaptiques excitateurs (VG1 et VG2) et inhibiteurs (VGAT) sur les motoneurones. B. Densités des contacts synaptiques VG1, VG2 et VGAT sur les dendrites SOD1 (rouge) et WT (bleu). C. Densités des contacts synaptiques VG1, VG2 et VGAT sur les dendrites SOD1, sur les varicosités (gris clair) et sur les segments dendritiques les séparant (gris foncé). D. Densités des contacts synaptiques VG1, VG2 et VGAT sur les dendrites WT, sur les varicosités (gris clair) et sur les segments dendritiques les séparant (gris foncé)

Conclusions

Nos résultats ont montré que les varicosités dendritiques des motoneurones SOD1-G93A se vacuolisent. Ces vacuoles grossissent au cours de la progression de la maladie et ce mécanisme semble être plus accentué dans les motoneurones *Fast*, les plus vulnérables à la pathologie. Cette vacuolisation apparaît également, dans une moindre mesure, dans les motoneurones WT, suggérant qu'elle pourrait constituer un mécanisme normal dans la physiologie des motoneurones, mais que le mécanisme de vacuolisation s'emballe au cours de la maladie. Nous avons montré que les synapses GABAergiques et glutamatergiques VGLUT2 (provenant probablement d'interneurones inhibiteurs et excitateurs) se concentraient sur les varicosités dendritiques. On peut donc supposer qu'il existe un lien causal entre l'activité synaptique et la vacuolisation dendritique. La couverture en synapses excitatrices et inhibitrices n'était toutefois pas modifiée entre les motoneurones SOD1 et WT. La vacuolisation des motoneurones SOD1 résulterait plus d'une activité synaptique anormale ou bien d'une plus grande vulnérabilité au stress calcique qu'à une modification de la couverture synaptique.

Discussion

La première étape de mon travail de thèse a consisté en la caractérisation de l'excitabilité des motoneurones de souris en conditions normales. Mes travaux ont en particulier permis de montrer qu'un état de faible excitabilité intrinsèque est à l'origine des oscillations de mode mixte qui apparaissent dans les motoneurones de souris. J'ai par la suite montré qu'une fraction des motoneurones devient encore moins excitable (hypoexcitabilité intrinsèque) dans les souris SOD1-G93A, modèle de la SLA, dans les jours qui précèdent les premières dénervations de jonctions neuromusculaires. Cette fraction de motoneurones est incapable de décharger de façon rythmique en réponse à un stimulus stationnaire. Finalement, j'ai consacré la dernière partie de mon travail à caractériser la vacuolisation dendritique des motoneurones SOD1-G93A qui apparaît et progresse au cours de la maladie et j'ai mis en évidence son lien avec la couverture synaptique des motoneurones.

Dans ce chapitre, je discuterai des apports de mes travaux dans la compréhension de la physiologie des motoneurones de souris et dans l'exploration des mécanismes physiopathologiques responsables de leur dégénérescence dans la SLA.

1 / Rôle des MMOs dans le comportement moteur chez la souris

Les études du système neuromusculaire chez le chat (Huizar et al. 1977; Dum & Kennedy 1980; Zengel et al. 1985; Cope et al. 1986) et le rat (Bakels & Kernell 1993a; b) ont montré une remarquable correspondance entre les propriétés intrinsèques des motoneurones et les propriétés contractiles de leurs unités motrices. Dans ces espèces, la fréquence à laquelle les motoneurones commencent à décharger correspond à la fréquence à laquelle les contractions musculaires unitaires commencent à se sommer. La fréquence de décharge des motoneurones augmente ensuite linéairement par rapport à l'excitation qu'ils reçoivent tout au long de la zone primaire, jusqu'à fusion tétanique complète des contractions musculaires. Chez le chat, l'AHP est un facteur essentiel dans le contrôle de cette fréquence de décharge (Manuel et al. 2006, cf. Chapitre I, Partie D).

Dans chaque unité motrice, sa durée correspond à celle des contractions unitaires des fibres musculaires (Burke 1980, 1981 ; Kernell 2006). Elle permet ainsi la production d'une force minimale aux plus basses fréquences de décharge puis une gradation progressive et linéaire de la force musculaire développée par l'unité motrice lorsque la fréquence de décharge augmente.

a) Rôle des MMOs dans le recrutement de la force musculaire chez la souris

Les MMOs présentes dans les motoneurones de souris créent une situation particulière pour la gradation de la force développée par les unités motrices. Elles produisent une zone sous-primaire dans laquelle la relation fréquence-courant est très pentue et induisent une grande variabilité dans la fréquence de décharge. Cette zone sous-primaire précède la zone primaire classique qui ne présente pas de MMOs et où la fréquence de décharge est très régulière. Manuel & Heckman ont récemment montré (2011) que la gradation de la force développée par les unités motrices de souris s'effectuait majoritairement au cours de cette zone sous-primaire. Lors de l'application au motoneurone d'une rampe lente de courant, la sommation des contractions unitaires commençait dès les premiers potentiels d'action et leur fusion tétanique était atteinte lors de l'apparition de la zone primaire de décharge. Cela est dû à plusieurs facteurs. 1) Une contraction plus lente que l'AHP ([Figure 18A](#) ; Manuel & Heckman 2011) : bien que les oscillations sous-seuil prolongent les intervalles entre les premiers potentiels d'action dans les motoneurones de souris, la durée des contractions musculaires unitaires permet néanmoins leur fusion dès le début de la décharge. 2) Une augmentation rapide de la fréquence de décharge en zone sous-primaire : l'état de faible excitabilité duquel émergent les MMOs est également responsable d'un retard dans le recrutement des motoneurones ([Figure 18B](#)), mais la fréquence de décharge augmente ensuite rapidement lors de la disparition des oscillations. La forte accélération de la décharge en zone sous-primaire permet alors d'atteindre rapidement la fréquence de fusion tétanique musculaire. 3) La fréquence de transition entre les zones sous-primaire et primaire est proche de la fréquence de fusion tétanique ([Figure 18C](#)). Autrement dit l'essentiel de la gradation de la force s'effectue en zone sous-primaire, contrairement au chat où la gradation de la force s'effectue en zone primaire. Puisque la durée des contractions unitaires diffère selon le type physiologique des unités motrices, des études chez le chat ont montré que la fusion

tétanique complète était atteinte pour des fréquences de décharges plus faibles dans les motoneurones Slow que Fast (25Hz et 85Hz respectivement en moyenne ; Burke 1967). On retrouve cette large gamme de fréquences de fusion tétnique chez la souris (45-100Hz ; Manuel & Heckman 2011) mais, dans cette espèce, la fusion tétnique est toujours atteinte à la transition entre la zone sous-primaire et la zone primaire (Figure 18C).

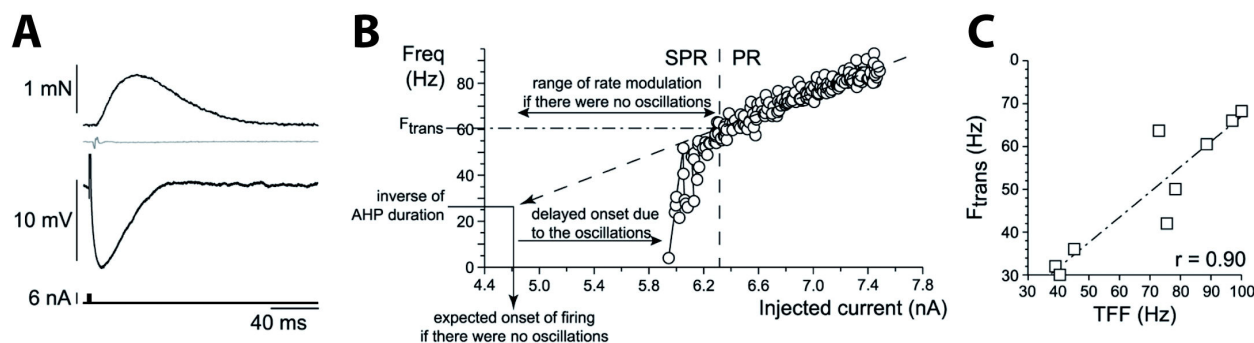


Figure 18 : Mécanismes permettant la gradation de la force en zone sous-primaire. A. Force musculaire (tracé du haut) généré par la contraction unitaire d'une unité motrice de souris en réponse à l'injection d'un bref créneau de courant (tracé du bas). Le tracé du milieu correspond au potentiel membranaire du motoneurone. On y voit la base du potentiel d'action suivi de son AHP. Notez que la durée de relaxation de l'AHP est plus courte que la contraction unitaire. B. Courbe courant fréquence d'un motoneurone en réponse à une rampe ascendante de courant. La ligne pointillée oblique indique la trajectoire théorique de cette relation si le motoneurone ne présentait pas de MMOs et si à fréquence minimale de décharge correspondait comme, chez le chat, à l'inverse de la durée de l'AHP. C. Fréquence de transition entre la zone sous-primaire et la zone primaire en fonction de la fréquence de fusion tétnique pour 9 motoneurones de souris. La droite de régression est indiquée en pointillé ($r=0,90$; $p=0,0005$). Adapté de Manuel & Heckman 2011.

Les expériences sur le chat (Kernell 2006), les primates (Palmer & Fetz 1985) et l'humain (Hornby et al. 2002) ont montré que la gradation de la force développée par un muscle était contrôlée par une combinaison du recrutement de ses motoneurones et de la modulation de leur fréquence de décharge. Chez la souris, l'état de faible excitabilité des motoneurones et les MMOs qui en émergent définissent une gamme étroite de courant pour laquelle la majeure partie de la force musculaire est générée. En conséquence, les unités motrices de souris pourrait être recrutées en « tout ou rien », ne laissant qu'un faible rôle à la modulation de la fréquence de décharge dans la gradation de la force. La seule stratégie pour augmenter la force musculaire développée par la souris serait alors de recruter plus d'unités motrices.

b) Courants entrants persistants et recrutement des unités motrices

Nos expériences sur les motoneurones de souris ont principalement été réalisées dans des conditions d'anesthésie aux barbituriques, réduisant considérablement les courants entrants persistants. Or nous avons montré que le courant sodique persistant avait tendance à réduire la zone sous-primaire en augmentant l'excitabilité des motoneurones ([Article 1, Figure 4](#)). Cette zone sous-primaire pourrait donc être absente durant le comportement normal des motoneurones dans lesquels les courants entrants persistants sont activés autour du seuil de décharge (Kuo et al. 2006). Les travaux de Marin Manuel à Chicago ont cependant montré que les MMOs et la zone sous-primaire étaient toujours présents dans les motoneurones sacro-caudaux *in vitro* même en l'absence d'anesthésie ([Article 2 Figure 8](#)). Une étude récente (Meehan et al. 2010) a également montré leur présence *in vivo* chez la souris anesthésiée au fentanyl/midazolam, et ce malgré une activation claire des courants entrants persistants. L'action conjointe de la faible excitabilité des motoneurones de souris et des courants entrants persistants pourrait renforcer leur recrutement en « tout ou rien ». L'activation des courants entrants persistants pourrait faire passer rapidement la décharge en zone primaire et donc permettre le développement de la force maximale des unités motrices dès leur recrutement.

c) Décharge des unités motrices dans le comportement de posture

Une étude de Ritter et al. (Ritter et al. 2014) remet en cause ce scénario en analysant la décharge des unités motrices de souris adultes durant le comportement normal, en l'absence d'anesthésie. Leurs enregistrements de signaux EMG dans le muscle gastrocnémien latéral ont révélé que les unités motrices de souris déchargeaient sur une large gamme de fréquence allant de 10 à 70Hz en moyenne au cours du comportement postural. Ces valeurs sont en partie comprises dans la gamme de fréquences rencontrées dans la zone sous-primaire des motoneurones ([Figure 18C](#)), même pour les plus excitables (présumées *Slow* et majoritairement recrutées dans le comportement postural), suggérant qu'une décharge stable dans le temps et une modulation de sa fréquence est possible en zone sous-primaire. Les plus hautes

fréquences de décharge observées correspondraient quant à elles à des unités motrices déchargeant en zone primaire et ayant atteint leur fréquence musculaire tétanique.

La plus grande variabilité de la fréquence de décharge due aux MMOs n'a pas été retrouvée dans cette étude : la variabilité était la même pour les unités motrices déchargeant aux plus basses fréquences que pour celles déchargeant aux plus hautes fréquences. Ceci pourrait s'expliquer par une absence complète de la zone sous-primaire liée l'activation des courants entrants persistants par les systèmes neuromodulateurs, mais cette explication n'est pas compatible avec les faibles fréquences de décharge observées. L'absence de diminution de la variabilité de la décharge pour les plus hautes fréquences pourrait en revanche être expliquée par l'augmentation de la variabilité en zone primaire à cause du bruit synaptique inhérent à l'état d'éveil du système.

d) La zone sous-primaire dans les autres espèces

Une zone de décharge sous-primaire précédant la zone primaire a récemment été observée dans les motoneurones de rat (Turkin et al. 2010). Chez le chat, bien que la décharge sur rampe commence dans la plupart des cas par une zone primaire linéaire, quelques potentiels d'action à plus basse fréquence précèdent parfois la zone primaire (Grillner & Udo 1971). Une zone sous-primaire semble enfin être exprimée par les motoneurones chez l'humain (Kudina & Alexeeva 1992; Kudina 1999), mais elle pourrait être causée par des fluctuations du bruit synaptique plutôt que par les mécanismes que nous avons révélés chez la souris.

2 / Diminution de l'excitabilité membranaire dans les souris SOD1-G93A adultes

De par l'habilité des motoneurones à maintenir leur homéostasie, il est difficile de déterminer, au cours de la SLA, quels sont les processus qui causent la dégénérescence et quels sont ceux qui vont constituer les mécanismes adaptatifs de la cellule lui permettant de maintenir sa fonction.

a) L'hyperexcitabilité des motoneurones est transitoire dans le modèle SOD1-G93A

L'hyperexcitabilité observée dans les motoneurones SOD1 aux stades prénataux et néonataux était en partie liée à une augmentation des courants entrants persistants (Kuo et al. 2005, Quinlan et al. 2011). Une telle augmentation semble toujours être présente dans les motoneurones SOD1 que nous avons enregistrés dans les jours précédant les premières dénervations, comme l'évoque la forte accélération de leur dépolarisation à l'approche du seuil de décharge (Article 2, Figure 3). Malgré cela, la plupart des motoneurones SOD1 montraient une remarquable homéostasie de leur excitabilité : leur courant de recrutement et leur relation courant – fréquence de décharge restaient similaires à ceux des motoneurones WT. Les effets de l'augmentation des courants entrants persistants étaient probablement compensés dans les motoneurones de souris SOD1 adultes par l'augmentation de la conductance d'entrée que nous avons mesurée. De cette façon, la diminution de la résistance d'entrée pourrait permettre aux motoneurones de maintenir une excitabilité cohérente avec les fonctions motrices et constituer un mécanisme de défense contre l'excitotoxicité. Cependant, si les courants entrants persistants ne sont pas suffisamment augmentés pour compenser l'augmentation de la conductance d'entrée, cela a des effets délétères sur le fonctionnement des motoneurones. C'est sans doute à cause de cette mauvaise compensation homéostatique qu'une fraction importante des motoneurones SOD1 (>40%) perdaient leur capacité à décharger de manière répétitive : ces motoneurones sont devenus hypoexcitables. Cette perte de fonction devrait contribuer à la diminution de la force produite par les unités motrice. De manière remarquable l'hypoexcitabilité précède la dénervation, ce qui devrait contribuer à la diminution de la force produite par les unités motrice. L'hypoexcitabilité d'un motoneurone SOD1 pourrait indiquer l'engagement dans le processus cellulaires de dégénérescences mais elle n'est probablement pas directement responsable de la dénervation des jonctions neuromusculaires puisque le blocage de la conduction axonale par TTX n'a pas d'impact sur la dénervation musculaire dans ce modèle (Carrasco et al. 2012).

b) La mutation SOD1-G93A affecte tous les motoneurones quelque soit leur type physiologique

L'augmentation de la conductance d'entrée que nous avons mesurée dans les motoneurones correspondait à un décalage de leur distribution vers de plus hautes valeurs, avec disparition complète des basses conductances. De plus, les motoneurones qui perdaient leur capacité à décharger de manière répétée étaient répartis sur l'ensemble de la gamme de conductance. Ceci suggère que même les motoneurones *Slow*, les plus résistants à la SLA, sont affectés par les mécanismes physiopathologiques dans le modèle SOD1-G93A. Cela reste à vérifier avec des expériences dans lesquelles le type physiologique de l'unité motrice sera déterminé sur la base de ses propriétés contractiles. Si tous les types physiologiques étaient atteints d'hypoexcitabilité, cela indiquerait que la vulnérabilité des unités motrices *Fast* n'est pas liée à une altération spécifique de leur excitabilité intrinsèque.

c) Origine de l'augmentation de la conductance d'entrée

L'augmentation de la conductance d'entrée des motoneurones SOD1 pourrait être causée soit par une augmentation de leur surface membranaire, soit par une augmentation de la conductivité membranaire spécifique ou encore une combinaison de ces deux facteurs. Comme mentionné précédemment (Chapitre III D b), plusieurs études rapportent une augmentation de la taille des motoneurones dans la SLA (Amendola & Durand 2008, Filipchuk & Durand 2012). ElBassiouny et collaborateurs (2010) montrent que cette augmentation de la taille des motoneurones ne pourrait expliquer qu'une fraction de l'augmentation de conductance membranaire. Une augmentation de la conductivité membranaire spécifique semble donc survenir dans les motoneurones SOD1. Elle n'est probablement pas attribuée à l'augmentation des courants entrants persistants puisque les conductances d'entrée ont été mesurées au potentiel de repos auquel les courants entrants persistants sont inactifs. En revanche, nos données suggèrent qu'à la fois le courant I_h et les courants de fuite sont augmentés dans les motoneurones SOD1 et pourraient donc contribuer à l'augmentation de la conductance d'entrée.

3 / Vacuolisation dendritique et excitotoxicité

Nos résultats montrent que les motoneurones ne présentent pas chez l'adulte d'hyperexcitabilité intrinsèque. Une excitotoxicité des motoneurones pourraient cependant être provoquée par une altération de leurs entrées synaptiques. A cet égard, la vacuolisation et l'augmentation de la taille des varicosités dendritiques observées dans les motoneurones des souris mSOD1 présente un intérêt particulier. Ce mécanisme a en effet été observé dans divers types neuronaux en réponse à une excitotoxicité glutamatergique. Dans les cultures de neurones corticaux et hippocampaux, chez la souris et le rat, l'application de NMDA provoquait l'apparition et le gonflement de varicosités (Hasbani et al. 1998; Ikegaya et al. 2001; Inoue & Okada 2007) associés à une dépolarisation mitochondriale (Greenwood et al. 2007) et à une déstructuration du cytosquelette (Hoskison et al. 2007). Ce phénomène est réversible si les conditions excitotoxiques sont temporaires mais persistent et conduisent à la mort cellulaire lorsqu'elles sont prolongées dans le temps. De la même façon que dans nos motoneurones, le gonflement des varicosités lié à l'application de NMDA commence dans les dendrites distales pour se propager ensuite vers le corps cellulaire.

a) Vacuolisation et résistance d'entrée

La formation de vacuoles de gros diamètre dans les motoneurones SOD1 augmente de manière évidente la surface membranaire de leurs dendrites. Si la densité des canaux membranaires est maintenue lors de la formation de ces vacuoles par l'expression de canaux supplémentaires, l'augmentation de surface membranaire pourrait contribuer à celle de la conductance d'entrée de ces motoneurones. De plus la vacuolisation provoque probablement un étirement local de la membrane dendritique. Or certains canaux ioniques, dont les canaux chloriques sensibles au volume (VSOR ; Okada 2006; Inoue & Okada 2007) et les canaux potassiques BK calcium dépendants ont des propriétés mécano-sensitives et peuvent s'ouvrir de manière mécanique lors de l'étirement de la membrane (Hammami et al. 2009; K. Takahashi & Naruse 2012). Ces canaux sont exprimés de façon quasi-ubiquitaire dans le système nerveux central (Okada 2006; Kyle et al. 2013) et leur activation lors de la vacuolisation pourrait contribuer à la fois à l'augmentation de la conductance d'entrée et à l'hypoexcitabilité des motoneurones SOD1.

Cependant, dans nos enregistrements, le potentiel de repos n'était en moyenne pas plus hyperpolarisé dans les motoneurones SOD1 que dans les WT. Ceci pourrait s'expliquer par une compensation du courant potassique BK par l'augmentation du courant Ih au repos.

b) La vacuolisation mitochondriale pourrait être un mécanisme de protection contre le stress excitotoxique

Des études ont montré que le gonflement des varicosités de neurones corticaux en présence de NMDA était atténué par la réduction de la concentration en sodium du milieu extracellulaire (Hasbani et al. 1998). Dans ces conditions, la proportion de neurones qui entraient en dégénérescence était toutefois plus importante (Ikegaya et al. 2001), suggérant l'effet protecteur du gonflement de ces varicosités.

La capture du calcium par les mitochondries est un facteur majeur dans la régulation de l'homéostasie calcique (Patergnani et al. 2011; Williams et al. 2013) et pourrait constituer un mécanisme protecteur dans la SLA. Or la surcharge calcique des mitochondries a pour effet d'activer les pores mitochondriaux de transition (mPTP ; Tadic et al. 2014) ce qui entraîne une entrée d'eau dans la mitochondrie (Bendotti et al. 2001, Halestrap et al. 2002) et pourrait être responsable de leur vacuolisation (Büki et al. 2000). Le fait que certaines des varicosités des motoneurones WT contenaient de petites vacuoles et que leur taux de vacuolisation augmente légèrement avec l'âge suggère que ce mécanisme est courant dans la physiologie normale des motoneurones et pourrait être lié au vieillissement cellulaire. Il pourrait cependant être exacerbé dans les motoneurones SOD1-G93A par une entrée massive de calcium liée à un excès d'excitation par rapport à l'inhibition, et conduire au gonflement anormal des mitochondries. Certaines études ont cependant révélé une diminution de la capacité des mitochondries à séquestrer le calcium dans les motoneurones SOD1-G93A (Fuchs et al. 2013; Nguyen et al. 2009), ainsi l'ouverture des mPTP et la vacuolisation pourraient avoir une origine autre que calcique. L'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène liée à l'accumulation de la protéine SOD1 dans les mitochondries (Higgins et al. 2003) pourrait avoir des effets similaires sur l'activation des mPTP (Tadic et al. 2014).

c) La vacuolisation pourrait être induite par une modification de l'excitabilité synaptique

Nous avons montré que la vacuolisation prenait place dans les motoneurones SOD1 à l'intérieur de varicosités dendritiques caractérisées par une forte densité synaptique, à la fois excitatrice et inhibitrice. Ce résultat suggère fortement qu'il existe un lien entre l'activité synaptique reçue par le motoneurone et sa vacuolisation. Toutefois les densités synaptiques sur les varicosités SOD1 ainsi que le ratio excitation/inhibition étaient similaires à ceux rencontrés sur les varicosités non vacuolisées des motoneurones WT. Mais bien que nous n'ayons pas observé de modification dans la couverture synaptique de ces motoneurones, il reste envisageable que l'activité synaptique inhibitrice ou excitatrice soit altérée dans les motoneurones SOD1 au cours de la SLA. Une augmentation de l'activité excitatrice aussi bien qu'une diminution de l'activité inhibitrice sur les motoneurones pourrait entraîner une surcharge calcique locale et provoquer la vacuolisation. De récentes études argumentent en faveur d'une diminution de l'efficacité des circuits inhibiteurs. Certains auteurs rapportent une diminution de la libération de GABA dans la moelle épinière de souris SOD1-93A pré-symptomatiques (Milanese et al. 2010) alors que d'autres ont montré une diminution de la sensibilité des récepteurs au GABA sur les motoneurones SOD1 en culture (Carunchio et al. 2008). D'autres encore pointent une diminution de la densité des récepteurs glycinergiques (Lorenzo et al. 2006) ou une perte des synapses glycinergiques sur les motoneurones (Chang & Martin 2009).

d) Progression de la vacuolisation et dégénérescence des motoneurones

Nous avons montré dans notre étude que les grosses vacuoles des motoneurones SOD1 apparaissaient dans un premier temps dans la partie distale de l'arborisation dendritique. Or les parties distales de l'arborisation dendritique ont un poids limité dans la physiologie du motoneurones : les synapses distales ont en effet un rôle relativement faible dans la relation entrée-sortie des motoneurones et le siège leur survie est situé dans son matériel génétique, au soma. Si la vacuolisation des mitochondries est un des facteurs déclenchant de la dégénérescence des motoneurones en obstruant le transport vésiculaire le long des dendrites ou encore en entraînant des dysfonctions mitochondriales et une diminution de la production d'ATP, ses effets devraient demeurer restreints jusqu'à

l'atteinte des mitochondries plus proximales. La progression centripète de la vacuolisation pourrait alors expliquer le caractère tardif de la neurodégénérescence dans la SLA.

e) Vulnérabilité différentielle des motoneurones et vacuolisation

Il a été établi que les motoneurones présentent une sensibilité différentielle à la SLA selon leur type physiologique : les motoneurones des unités FF dégénèrent en premier, suivis par les motoneurones des unités FR alors que ceux des unités S résistent (Pun et al. 2006, Hegedus et al. 2007). Dans notre échantillon, les motoneurones présumés *Fast* (FF et FR) montraient en moyenne une progression plus rapide de la vacuolisation que les motoneurones *Slow*. Cette observation est en accord avec la plus grande vulnérabilité à la SLA des motoneurones *Fast* et pourrait être liée à une plus grande activité excitatrice reçue par ces motoneurones, leur ratio entre synapses excitatrices et inhibitrices étant plus élevée que celui des motoneurones *Slow* (Conradi et al. 1979; Conradi et al. 1983; Brännström 1993).

4 / Perspectives

Nous avons montré que les motoneurones n'étaient pas intrinsèquement hyperexcitables dans la SLA durant les jours précédant leurs dénervations. Une excitotoxicité d'origine extrinsèque est cependant toujours envisageable : nos expériences suggèrent un lien entre, d'une part, la dégénérescence des motoneurones et leur vacuolisation et, d'autre part, une perturbation de l'activité synaptique qu'ils perçoivent. Pour vérifier ce point, il sera à la fois nécessaire de mesurer le taux d'expression et la localisation des récepteurs post-synaptiques exprimés par les motoneurones au cours de la progression de la maladie et de mesurer l'activité des réseaux spinaux inhibiteurs et excitateurs projetant sur les motoneurones ainsi que l'état des systèmes neuromodulateurs dans la SLA.

Si une modification de l'activité synaptique perçue par les motoneurones dépend de leurs types physiologiques, elle pourrait rendre compte de la vulnérabilité différentielle des unités motrices dans la SLA. Il est pour cela crucial de pouvoir identifier de façon robuste le type physiologique des unités motrices étudiées chez la souris. Cette identification peut à la fois reposer sur des critères électrophysiologiques ou moléculaires (marqueurs immunohistochimiques), mais nécessitent d'être confirmés sur la base de critères mécaniques (vitesse de contraction et force développée). Des marqueurs moléculaires de type physiologique commencent à émerger de différents travaux mais sont sujets à divers changements au cours du développement et nécessitent confirmation.

Bibliographie

- Abel HJ, Lee JCF, Callaway JC, Foehring RC. (2004). "Relationships between Intracellular Calcium and Afterhyperpolarizations in Neocortical Pyramidal Neurons." *Journal of Neurophysiology* 91 (1): 324–35.
- Acsadi G, Anguelov RA, Yang H, Toth G, Thomas R, Jani A, Wang Y, Ianakova E, Mohammad S, Lewis RA, Shy ME. (2002). "Increased Survival and Function of SOD1 Mice after Glial Cell-Derived Neurotrophic Factor Gene Therapy." *Human Gene Therapy* 13 (9): 1047–59.
- Alaburda A, Perrier JF, Hounsgaard J. (2002). "Mechanisms Causing Plateau Potentials in Spinal Motoneurons." *Advances in Experimental Medicine and Biology* 508: 219–26.
- Alexianu ME, Ho BK, Mohamed AH, La Bella V, Smith RG, Appel SH. (1994). "The Role of Calcium-Binding Proteins in Selective Motoneuron Vulnerability in Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Annals of Neurology* 36 (6): 846–58.
- Amendola J & Durand J. (2008). "Morphological Differences between Wild-Type and Transgenic Superoxide Dismutase 1 Lumbar Motoneurons in Postnatal Mice." *The Journal of Comparative Neurology* 511 (3): 329–41.
- Andersen PM & Al-Chalabi A. (2011). "Clinical Genetics of Amyotrophic Lateral Sclerosis: What Do We Really Know?" *Nature Reviews. Neurology* 7 (11): 603–15.
- Andrade R, Foehring RC, Tzingounis AV. (2012). "The Calcium-Activated Slow AHP: Cutting through the Gordian Knot." *Frontiers in Cellular Neuroscience* 6: 47.
- Andrus PK, Fleck TJ, Gurney ME, Hall ED. (1998). "Protein Oxidative Damage in a Transgenic Mouse Model of Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Journal of Neurochemistry* 71 (5): 2041–48.
- Annex BH, Torgan CE, Lin P, Taylor DA, Thompson MA, Peters KG, Kraus WE. (1998). "Induction and Maintenance of Increased VEGF Protein by Chronic Motor Nerve Stimulation in Skeletal Muscle." *The American Journal of Physiology* 274 (3 Pt 2): H860–67.
- Araki T & Terzuolo CA. (1962). "Membrane Currents in Spinal Motoneurons Associated with the Action Potential and Synaptic Activity." *Journal of Neurophysiology* 25 (November): 772–89.
- Azbill RD, Mu X, Springer JE. (2000). "Riluzole Increases High-Affinity Glutamate Uptake in Rat Spinal Cord Synaptosomes." *Brain Research* 871 (2): 175–80.
- Azzouz M, RalphGS, Storkebaum E, Walmsley LE, Mitrophanous KA, Kingsman SM, Carmeliet P, Mazarakis ND. (2004). "VEGF Delivery with Retrogradely Transported Lentivector Prolongs Survival in a Mouse ALS Model." *Nature* 429 (6990): 413–17.
- Bakels R & Kernell D. (1993a). "Matching between Motoneuron and Muscle Unit Properties in Rat Medial Gastrocnemius." *The Journal of Physiology* 463 (April): 307–24.

- Bakels R & Kernell D. (1993b). "Average but Not Continuous Speed Match between Motoneurons and Muscle Units of Rat Tibialis Anterior." *Journal of Neurophysiology* 70 (4): 1300–1306.
- Baldissera F & Gustafsson B. (1974a). "Firing Behaviour of a Neurone Model Based on the Afterhyperpolarization Conductance Time Course. First Interval Firing." *Acta Physiologica Scandinavica* 91 (4): 528–44.
- Baldissera F & Gustafsson B. (1974b). "Firing Behaviour of a Neurone Model Based on the Afterhyperpolarization Conductance Time Course and Algebraical Summation. Adaptation and Steady State Firing." *Acta Physiologica Scandinavica* 92 (1): 27–47.
- Barrett EF, Barrett JN, Crill WE. (1980). "Voltage-Sensitive Outward Currents in Cat Motoneurons." *The Journal of Physiology* 304 (July): 251–76.
- Barrett JN & Crill WE. (1971). "Specific Membrane Resistivity of Dye-Injected Cat Motoneurons." *Brain Research* 28 (3): 556–61.
- Barrett JN & Crill WE. (1980). "Voltage Clamp of Cat Motoneurone Somata: Properties of the Fast Inward Current." *The Journal of Physiology* 304 (July): 231–49.
- Bateson DS & Parry DJ. (1983). "Motor Units in a Fast-Twitch Muscle of Normal and Dystrophic Mice." *The Journal of Physiology* 345 (December): 515–23.
- Bayliss DA, Umemiya M, Berger AJ. (1995). "Inhibition of N- and P-Type Calcium Currents and the after-Hyperpolarization in Rat Motoneurons by Serotonin." *The Journal of Physiology* 485 (Pt 3) (June): 635–47.
- Bayliss DA, Viana F, Berger AJ. (1992). "Mechanisms Underlying Excitatory Effects of Thyrotropin-Releasing Hormone on Rat Hypoglossal Motoneurons in Vitro." *Journal of Neurophysiology* 68 (5): 1733–45.
- Beal MF. (2002). "Oxidatively Modified Proteins in Aging and Disease." *Free Radical Biology & Medicine* 32 (9): 797–803.
- Beckman JS, Carson M, Smith CD, Koppenol WH. (1993). "ALS, SOD and Peroxynitrite." *Nature* 364 (6438): 584.
- Beers DR, Ho BK, Siklós L, Alexianu ME, Mosier DR, Mohamed AH, Otsuka Y, Kosovska ME, McAlhany RE, Smith RG, Appel SH. (2001). "Parvalbumin Overexpression Alters Immune-Mediated Increases in Intracellular Calcium, and Delays Disease Onset in a Transgenic Model of Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Journal of Neurochemistry* 79 (3): 499–509.
- Bendotti C, Calvaresi N, Chiveri L, Prella A, Moggio M, Braga M, Silani V, De Biasi S. (2001). "Early Vacuolization and Mitochondrial Damage in Motor Neurons of FALS Mice Are Not Associated with Apoptosis or with Changes in Cytochrome Oxidase Histochemical Reactivity." *Journal of the Neurological Sciences* 191 (1-2): 25–33.
- Bennett DJ, Hultborn H, Fedirchuk B, Gorassini M. (1998). "Synaptic Activation of Plateaus in Hindlimb Motoneurons of Decerebrate Cats." *Journal of Neurophysiology* 80 (4): 2023–37.
- Bennett DJ, Li Y, Harvey PJ, Gorassini M. (2001). "Evidence for Plateau Potentials in Tail Motoneurons of Awake Chronic Spinal Rats with Spasticity." *Journal of Neurophysiology* 86 (4): 1972–82.

- Bennett DJ, Li Y, Siu M. (2001). "Plateau Potentials in Sacrocaudal Motoneurons of Chronic Spinal Rats, Recorded in Vitro." *Journal of Neurophysiology* 86 (4): 1955–71.
- Bergmann F & Keller BU. (2004). "Impact of Mitochondrial Inhibition on Excitability and Cytosolic Ca²⁺ Levels in Brainstem Motoneurons from Mouse." *The Journal of Physiology* 555 (Pt 1): 45–59.
- Bernard-Marissal N, Moumen A, Sunyach C, Pellegrino C, Dudley K, Henderson CE, Raoul C, Pettmann B. (2012). "Reduced Calreticulin Levels Link Endoplasmic Reticulum Stress and Fas-Triggered Cell Death in Motoneurons Vulnerable to ALS." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 32 (14): 4901–12.
- Bertrand S & Cazalets JR. (1998). "Postinhibitory Rebound during Locomotor-like Activity in Neonatal Rat Motoneurons in Vitro." *Journal of Neurophysiology* 79 (1): 342–51.
- Bessou P, Emonet-Dénand F, Laporte F. (1965). "Motor Fibres Innervating Extrafusal and Intrafusal Muscle Fibres in the Cat." *The Journal of Physiology* 180 (3): 649–72.
- Bessou P, Laporte Y, Pages B. (1965). "[Similarity of Effects (Static or Dynamic) Exerted by Single Spindle-Shaped Motor Fibers on Primary Endings of Several Spindles in the Cat]." *Journal De Physiologie* 57 (February): 228–29.
- Boillée S, & Cleveland DW. (2008). "Revisiting Oxidative Damage in ALS: Microglia, Nox, and Mutant SOD1." *The Journal of Clinical Investigation* 118 (2): 474–78.
- Boillée S, Vande Velde C, Cleveland DW. (2006). "ALS: A Disease of Motor Neurons and Their Nonneuronal Neighbors." *Neuron* 52 (1): 39–59.
- Boillée S, Yamanaka K, Lobsiger CS, Copeland NG, Jenkins NA, Kassiotis G, Kollias G, Cleveland DW. (2006). "Onset and Progression in Inherited ALS Determined by Motor Neurons and Microglia." *Science (New York, N.Y.)* 312 (5778): 1389–92.
- Borchelt DR, Lee MK, Slunt HS, Guarnieri M, Xu ZS, Wong PC, Brown RH, Price DL, Sisodia SS, Cleveland DW. (1994). "Superoxide Dismutase 1 with Mutations Linked to Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis Possesses Significant Activity." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (17): 8292–96.
- Bories C, Amendola J, Lamotte d'Incamps B, Durand J. (2007). "Early Electrophysiological Abnormalities in Lumbar Motoneurons in a Transgenic Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis." *The European Journal of Neuroscience* 25 (2): 451–59.
- Borthwick GM, Taylor RW, Walls TJ, Tonska K, Taylor GA, Shaw PJ, Ince PG, Turnbull DM. (2006). "Motor Neuron Disease in a Patient with a Mitochondrial tRNA^{Ala} Mutation." *Annals of Neurology* 59 (3): 570–74.
- Borthwick GM, Johnson MA, Ince PG, Shaw PJ, Turnbull DM. (1999). "Mitochondrial Enzyme Activity in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Implications for the Role of Mitochondria in Neuronal Cell Death." *Annals of Neurology* 46 (5): 787–90.
- Bostock H, Sharief MK, Reid G, Murray NM. (1995). "Axonal Ion Channel Dysfunction in Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Brain: A Journal of Neurology* 118 (Pt 1) (February): 217–25.

- Brännström T. (1993). "Quantitative Synaptology of Functionally Different Types of Cat Medial Gastrocnemius Alpha-Motoneurons." *The Journal of Comparative Neurology* 330 (3): 439–54.
- Bras H, Gogan P, Tyc-Dumont S. (1987). "The Dendrites of Single Brain-Stem Motoneurons Intracellularly Labelled with Horseradish Peroxidase in the Cat. Morphological and Electrical Differences." *Neuroscience* 22 (3): 947–70.
- Bras H, Korogod S, Driencourt Y, Gogan P, Tyc-Dumont S. (1993). "Stochastic Geometry and Electronic Architecture of Dendritic Arborization of Brain Stem Motoneuron." *The European Journal of Neuroscience* 5 (11): 1485–93.
- Brismar T. (1977). "Slow Mechanism for Sodium Permeability Inactivation in Myelinated Nerve Fibre of *Xenopus Laevis*." *The Journal of Physiology* 270 (2): 283–97.
- Brockington A, Ning K, Heath PR, Wood E, Kirby J, Fusi N, Lawrence N, Wharton SB, Ince PG, Shaw PJ. (2013). "Unravelling the Enigma of Selective Vulnerability in Neurodegeneration: Motor Neurons Resistant to Degeneration in ALS Show Distinct Gene Expression Characteristics and Decreased Susceptibility to Excitotoxicity." *Acta Neuropathologica* 125 (1): 95–109.
- Brock LG, Coombs JS, Eccles JC. (1952). "The Recording of Potentials from Motoneurons with an Intracellular Electrode." *The Journal of Physiology* 117 (4): 431–60.
- Brooke MH & Kaiser KK. (1970). "Muscle Fiber Types: How Many and What Kind?" *Archives of Neurology* 23 (4): 369–79.
- Brown AG & Fyffe RE. (1981). "Direct Observations on the Contacts Made between Ia Afferent Fibres and Alpha-Motoneurons in the Cat's Lumbosacral Spinal Cord." *The Journal of Physiology* 313: 121–40.
- Bruening W, Roy J, Giasson B, Figlewicz DA, Mushynski WE, Durham HD. (1999). "Up-Regulation of Protein Chaperones Preserves Viability of Cells Expressing Toxic Cu/Zn-Superoxide Dismutase Mutants Associated with Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Journal of Neurochemistry* 72 (2): 693–99.
- Bruijn LI, Beal MF, Becher MW, Schulz JB, Wong PC, Price DL, Cleveland DW. (1997). "Elevated Free Nitrotyrosine Levels, but Not Protein-Bound Nitrotyrosine or Hydroxyl Radicals, throughout Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS)-like Disease Implicate Tyrosine Nitration as an Aberrant in Vivo Property of One Familial ALS-Linked Superoxide Dismutase 1 Mutant." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (14): 7606–11.
- Bruijn LI, Becher MW, Lee MK, Anderson KL, Jenkins NA, Copeland NG, Sisodia SS, Rothstein JD, Borchelt DR, Price DL, Cleveland DW. (1997). "ALS-Linked SOD1 Mutant G85R Mediates Damage to Astrocytes and Promotes Rapidly Progressive Disease with SOD1-Containing Inclusions." *Neuron* 18 (2): 327–38.
- Bruijn LI, Houseweart MK, Kato S, Anderson KL, Anderson SD, Ohama E, Reaume AG, Scott RW, Cleveland DW. (1998). "Aggregation and Motor Neuron Toxicity of an ALS-Linked SOD1 Mutant Independent from Wild-Type SOD1." *Science (New York, N.Y.)* 281 (5384): 1851–54.

- Bui TV, Ter-Mikaelian M, Bedrossian D, Rose PK. (2006). "Computational Estimation of the Distribution of L-Type Ca(2+) Channels in Motoneurons Based on Variable Threshold of Activation of Persistent Inward Currents." *Journal of Neurophysiology* 95 (1): 225–41.
- Büki A, Okonkwo DO, Wang KK, Povlishock JT. (2000). "Cytochrome c Release and Caspase Activation in Traumatic Axonal Injury." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 20 (8): 2825–34.
- Burke RE. (1981). "Motor Units: Anatomy, Physiology, and Functional Organization." dans *Handbook of Physiology – The Nervous System II* (Ch10).
- Burke RE, Dum RP, Fleshman JW, Glenn LL, Lev-Tov A, O'Donovan MJ, Pinter MJ. (1982). "A HRP Study of the Relation between Cell Size and Motor Unit Type in Cat Ankle Extensor Motoneurons." *The Journal of Comparative Neurology* 209 (1): 17–28.
- Burke RE, Levine DN, Tsairis P, Zajac FE. (1973). "Physiological Types and Histochemical Profiles in Motor Units of the Cat Gastrocnemius." *The Journal of Physiology* 234 (3): 723–48.
- Burke RE, Levine DN, Zajac FE. (1971). "Mammalian Motor Units: Physiological-Histochemical Correlation in Three Types in Cat Gastrocnemius." *Science (New York, N.Y.)* 174 (4010): 709–12.
- Burke RE & Nelson PG. (1971). "Accommodation to Current Ramps in Motoneurons of Fast and Slow Twitch Motor Units." *The International Journal of Neuroscience* 1 (6): 347–56.
- Burke RE, Rudomin P, Zajac FE. (1970). "Catch Property in Single Mammalian Motor Units." *Science (New York, N.Y.)* 168 (3927): 122–24.
- Burke RE & Tsairis P. (1973). "Anatomy and Innervation Ratios in Motor Units of Cat Gastrocnemius." *The Journal of Physiology* 234 (3): 749–65.
- Butrimas P & Gutman A. (1978). "[Theoretical analysis of an experiment with motor neuron voltage clamping. Proof of the N-shape of the steady-state volt-ampere characteristic of the dendrite membrane]." *Biofizika* 23 (5): 888–94.
- Calvin WH. (1974). "Three Modes of Repetitive Firing and the Role of Threshold Time Course between Spikes." *Brain Research* 69 (2): 341–46.
- Calvin WH & Stevens CF. (1968). "Synaptic Noise and Other Sources of Randomness in Motoneuron Interspike Intervals." *Journal of Neurophysiology* 31 (4): 574–87.
- Cameron WE, Averill DB, Berger AJ. (1983). "Morphology of Cat Phrenic Motoneurons as Revealed by Intracellular Injection of Horseradish Peroxidase." *The Journal of Comparative Neurology* 219 (1): 70–80.
- Cameron WE, Averill DB, Berger AJ. (1985). "Quantitative Analysis of the Dendrites of Cat Phrenic Motoneurons Stained Intracellularly with Horseradish Peroxidase." *The Journal of Comparative Neurology* 231 (1): 91–101.
- Capel F, Buffière C, Patureau Mirand P, Mosoni L. (2004). "Differential Variation of Mitochondrial H₂O₂ Release during Aging in Oxidative and Glycolytic Muscles in Rats." *Mechanisms of Ageing and Development* 125 (5): 367–73.

- Carlin KP, Jiang Z, Brownstone RM. (2000). "Characterization of Calcium Currents in Functionally Mature Mouse Spinal Motoneurons." *The European Journal of Neuroscience* 12 (5): 1624–34.
- Carlin KP, Jones KE, Jiang Z, Jordan LM, Brownstone RM. (2000). "Dendritic L-Type Calcium Currents in Mouse Spinal Motoneurons: Implications for Bistability." *The European Journal of Neuroscience* 12 (5): 1635–46.
- Carrasco DI, Bichler EK, Rich MM, Wang X, Seburn KL, Pinter MJ. (2012). "Motor Terminal Degeneration Unaffected by Activity Changes in SOD1(G93A) Mice; a Possible Role for Glycolysis." *Neurobiology of Disease* 48 (1): 132–40.
- Carunchio I, Mollinari C, Pieri M, Merlo D, Zona C. (2008). "GAB(A) Receptors Present Higher Affinity and Modified Subunit Composition in Spinal Motor Neurons from a Genetic Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis." *The European Journal of Neuroscience* 28 (7): 1275–85.
- Chandler SH, Hsiao CF, Inoue T, Goldberg LJ. (1994). "Electrophysiological Properties of Guinea Pig Trigeminal Motoneurons Recorded in Vitro." *Journal of Neurophysiology* 71 (1): 129–45.
- Chang LY, Slot JW, Geuze HJ, Crapo JD. (1988). "Molecular Immunocytochemistry of the CuZn Superoxide Dismutase in Rat Hepatocytes." *The Journal of Cell Biology* 107 (6 Pt 1): 2169–79.
- Chang Q & Martin LJ. (2009). "Glycinergic Innervation of Motoneurons Is Deficient in Amyotrophic Lateral Sclerosis Mice: A Quantitative Confocal Analysis." *The American Journal of Pathology* 174 (2): 574–85.
- Charcot JM & Joffroy A. (1869). "Deux Cas D'atrophie Musculaire Progressive Avec Lésions de La Substance Grise et Des Faisceaux Antérolatéraux de La Moelle Épinière" *Archives de Physiologie Normale et Pathologique* 2: 354–67.
- Chiu AY, Zhai P, Dal Canto MC, Peters TM, Kwon YW, Prattis SM, Gurney ME. (1995). "Age-Dependent Penetrance of Disease in a Transgenic Mouse Model of Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Molecular and Cellular Neurosciences* 6 (4): 349–62.
- Cho M. (2013). "Oligodendrocyte Failure in ALS." *Nature Neuroscience* 16 (5): 525.
- Clements JD & Redman SJ. (1989). "Cable Properties of Cat Spinal Motoneurons Measured by Combining Voltage Clamp, Current Clamp and Intracellular Staining." *The Journal of Physiology* 409 (February): 63–87.
- Cleveland DW & Rothstein JD. (2001). "From Charcot to Lou Gehrig: Deciphering Selective Motor Neuron Death in ALS." *Nature Reviews. Neuroscience* 2 (11): 806–19.
- Colbert CM, Magee JC, Hoffman DA, Johnston D. (1997). "Slow Recovery from Inactivation of Na⁺ Channels Underlies the Activity-Dependent Attenuation of Dendritic Action Potentials in Hippocampal CA1 Pyramidal Neurons." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 17 (17): 6512–21.
- Comi GP, Bordoni A, Salani S, Franceschina L, Sciacco M, Prella A, Fortunato F, Zeviani M, Napoli L, Bresolin N, Moggio M, Ausenda CD, Taanman JW, Scarlato G. (1998). "Cytochrome c Oxidase Subunit I Microdeletion in a Patient with Motor Neuron Disease." *Annals of Neurology* 43 (1): 110–16.

- Conradi S, Cullheim S, Gollvik L, Kellerth JO. (1983). "Electron Microscopic Observations on the Synaptic Contacts of Group Ia Muscle Spindle Afferents in the Cat Lumbosacral Spinal Cord." *Brain Research* 265 (1): 31–39.
- Conradi S, Kellerth JO, Berthold CH. (1979). "Electron Microscopic Studies of Serially Sectioned Cat Spinal Alpha-Motoneurons. II. A Method for the Description of Architecture and Synaptology of the Cell Body and Proximal Dendritic Segments." *The Journal of Comparative Neurology* 184 (4): 741–54.
- Conway BA, Hultborn H, Kiehn O, Mintz I. (1988). "Plateau Potentials in Alpha-Motoneurons Induced by Intravenous Injection of L-Dopa and Clonidine in the Spinal Cat." *The Journal of Physiology* 405 (November): 369–84.
- Coombs JS, Curtis DR, Eccles JC. (1957). "The Interpretation of Spike Potentials of Motoneurons." *The Journal of Physiology* 139 (2): 198–231.
- Coombs JS, Eccles JC, Fatt P. (1955). "The Electrical Properties of the Motoneurone Membrane." *The Journal of Physiology* 130 (2): 291–325.
- Cope TC, Bodine SC, Fournier M, Edgerton VR. (1986). "Soleus Motor Units in Chronic Spinal Transected Cats: Physiological and Morphological Alterations." *Journal of Neurophysiology* 55 (6): 1202–20.
- Couillard-Després S, Meier J, Julien JP. (2000). "Extra Axonal Neurofilaments Do Not Exacerbate Disease Caused by Mutant Cu,Zn Superoxide Dismutase." *Neurobiology of Disease* 7 (4): 462–70.
- Couratier P, Marin B, Lautrette G, Nicol M, Preux PM. (2014). "[Epidemiology, clinical spectrum of ALS and differential diagnoses]." *Presse Médicale (Paris, France: 1983)* 43 (5): 538–48.
- Crapo JD, Oury T, Rabouille C, Slot JW, Chang LW. (1992). "Copper,zinc Superoxide Dismutase Is Primarily a Cytosolic Protein in Human Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (21): 10405–9.
- Crill WE. (1996). "Persistent Sodium Current in Mammalian Central Neurons." *Annual Review of Physiology* 58: 349–62.
- Crone C, Hultborn H, Kiehn O, Mazieres L, Wigström H. (1988). "Maintained Changes in Motoneuronal Excitability by Short-Lasting Synaptic Inputs in the Decerebrate Cat." *The Journal of Physiology* 405 (November): 321–43.
- Cullheim S, Fleshman JW, Glenn LL, Burke RE. (1987a). "Three-Dimensional Architecture of Dendritic Trees in Type-Identified Alpha-Motoneurons." *The Journal of Comparative Neurology* 255 (1): 82–96.
- Cullheim S, Fleshman JW, Glenn LL, Burke RE. (1987b).. "Membrane Area and Dendritic Structure in Type-Identified Triceps Suræ Alpha Motoneurons." *The Journal of Comparative Neurology* 255 (1): 68–81.
- Cullheim S & Kellerth JO. (1978). "A Morphological Study of the Axons and Recurrent Axon Collaterals of Cat Sciatic Alpha-Motoneurons after Intracellular Staining with Horseradish Peroxidase." *The Journal of Comparative Neurology* 178 (3): 537–57.

- David G, Nguyen K, Barrett EF. (2007). "Early Vulnerability to Ischemia/reperfusion Injury in Motor Terminals Innervating Fast Muscles of SOD1-G93A Mice." *Experimental Neurology* 204 (1): 411–20.
- Debono MW, Le Guern J, Canton T, Doble A, Pradier L. (1993). "Inhibition by Riluzole of Electrophysiological Responses Mediated by Rat Kainate and NMDA Receptors Expressed in *Xenopus* Oocytes." *European Journal of Pharmacology* 235 (2-3): 283–89.
- Deng HX, Chen W, Hong ST, Boycott KM, Gorrie GH, Siddique N, Yang Y, Fecto F, Shi Y, Zhai H, Jiang H, Hirano M, Rampersaud E, Jansen GH, Donkervoort S, Bigio EH, Brooks BR, Ajroud K, Sufit RL, Haines JL, Mugnaini E, Pericak-Vance M, Siddique T. (2011). "Mutations in UBQLN2 Cause Dominant X-Linked Juvenile and Adult-Onset ALS and ALS/dementia." *Nature* 477 (7363): 211–15.
- Dengler R, Konstanzer A, Küther G, Hesse S, Wolf W, Struppler A. (1990). "Amyotrophic Lateral Sclerosis: Macro-EMG and Twitch Forces of Single Motor Units." *Muscle & Nerve* 13 (6): 545–50.
- Dum RP & Kennedy TT. (1980). "Physiological and Histochemical Characteristics of Motor Units in Cat Tibialis Anterior and Extensor Digitorum Longus Muscles." *Journal of Neurophysiology* 43 (6): 1615–30.
- Dunckley T, Huentelman MJ, Craig DW, Pearson JV, Szelinger S, Joshipura K, Halperin RF, Stamper C, Jensen KR, Letizia D, Hesterlee SE, Pestronk A, Levine T, Bertorini T, Graves MC, Mozaffar T, Jackson TE, Bosh P, McVeil A, Dick A, Barohn R, Lomen-Hoerth C, Rosenfeld J, O'connor DT, Zhang K, Crook R, Ryberg H, Hutton M, Katz J, Simpson EP, Mitsumoto H, Bowser R, Miller RG, Appel SH, Stephan DA. (2007). "Whole-Genome Analysis of Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis." *The New England Journal of Medicine* 357 (8): 775–88.
- Dunlop JH, McIlvain H, She Y, Howland DS. (2003). "Impaired Spinal Cord Glutamate Transport Capacity and Reduced Sensitivity to Riluzole in a Transgenic Superoxide Dismutase Mutant Rat Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 23 (5): 1688–96.
- Eccles JC, Eccles RM, Lundberg A. (1958). "The Action Potentials of the Alpha Motoneurons Supplying Fast and Slow Muscles." *The Journal of Physiology* 142 (2): 275–91.
- Egger MD, Freeman NC, Proshansky E. (1980). "Morphology of Spinal Motoneurons Mediating a Cutaneous Spinal Reflex in the Cat." *The Journal of Physiology* 306 (September): 349–63.
- Elbasiouny SM, Amendola J, Durand J, Heckman CJ. (2010). "Evidence from Computer Simulations for Alterations in the Membrane Biophysical Properties and Dendritic Processing of Synaptic Inputs in Mutant Superoxide Dismutase-1 Motoneurons." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 30 (16): 5544–58.
- Elliott P & Wallis DI. (1992). "Serotonin and L-Norepinephrine as Mediators of Altered Excitability in Neonatal Rat Motoneurons Studied in Vitro." *Neuroscience* 47 (3): 533–44.
- Emonet-Denand F, Laporte Y, Matthews PB, Petit J. (1977). "On the Subdivision of Static and Dynamic Fusimotor Actions on the Primary Ending of the Cat Muscle Spindle." *The Journal of Physiology* 268 (3): 827–61.

- Fahim MA, Holley JA, Robbins N. (1984). "Topographic Comparison of Neuromuscular Junctions in Mouse Slow and Fast Twitch Muscles." *Neuroscience* 13 (1): 227–35.
- Feiereisen P, Duchateau J, Hainaut K. (1997). "Motor Unit Recruitment Order during Voluntary and Electrically Induced Contractions in the Tibialis Anterior." *Experimental Brain Research* 114 (1): 117–23.
- Ferrucci M, Spalloni A, Bartalucci A, Cantafora E, Fulceri F, Nutini M, Longone P, Paparelli A, Fornai F. (2010). "A Systematic Study of Brainstem Motor Nuclei in a Mouse Model of ALS, the Effects of Lithium." *Neurobiology of Disease* 37 (2): 370–83.
- Filipchuk AA & Durand J. (2012). "Postnatal Dendritic Development in Lumbar Motoneurons in Mutant Superoxide Dismutase 1 Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Neuroscience* 209 (May): 144–54.
- Fischer LR, Culver DG, Tennant P, Davis AA, Wang M, Castellano-Sanchez A, Khan J, Polak MA, Glass JD. (2004). "Amyotrophic Lateral Sclerosis Is a Distal Axonopathy: Evidence in Mice and Man." *Experimental Neurology* 185 (2): 232–40.
- Fischer LR & Glass JD. (2007). "Axonal Degeneration in Motor Neuron Disease." *Neuro-Degenerative Diseases* 4 (6): 431–42.
- Fleidervish IA, Friedman A, Gutnick MJ. (1996). "Slow Inactivation of Na⁺ Current and Slow Cumulative Spike Adaptation in Mouse and Guinea-Pig Neocortical Neurons in Slices." *The Journal of Physiology* 493 (Pt 1) (May): 83–97.
- Fleshman JW, Segev I, Burke RB. (1988). "Electrotonic Architecture of Type-Identified Alpha-Motoneurons in the Cat Spinal Cord." *Journal of Neurophysiology* 60 (1): 60–85.
- Frankenhaeuser B & Vallbo AB. (1965). "Accommodation in Myelinated Nerve Fibres of *Xenopus laevis* as Computed on the Basis of Voltage Clamp Data." *Acta Physiologica Scandinavica* 63 (February): 1–20.
- French CR, Sah P, Buckett KJ, Gage PW. (1990). "A Voltage-Dependent Persistent Sodium Current in Mammalian Hippocampal Neurons." *The Journal of General Physiology* 95 (6): 1139–57.
- Frey D, Schneider C, Xu L, Borg J, Spooren W, Caroni P. (2000). "Early and Selective Loss of Neuromuscular Synapse Subtypes with Low Sprouting Competence in Motoneuron Diseases." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 20 (7): 2534–42.
- Fridovich I. (1986). "Biological Effects of the Superoxide Radical." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 247 (1): 1–11.
- Fridovich I. (1995). "Superoxide Radical and Superoxide Dismutases." *Annual Review of Biochemistry* 64: 97–112.
- Fritz E, Izaurieta P, Weiss A, Mir FR, Rojas P, Gonzalez D, Rojas F, Brown Jr RH, Madrid R, van Zundert B. (2013). "Mutant SOD1-Expressing Astrocytes Release Toxic Factors That Trigger Motoneuron Death by Inducing Hyperexcitability." *Journal of Neurophysiology* 109 (11): 2803–14.

- Fuchs A, Kutterer S, Mühling T, Duda J, Schütz B, Liss B, Keller BU, Roeper J. (2013). "Selective Mitochondrial Ca²⁺ Uptake Deficit in Disease Endstage Vulnerable Motoneurons of the SOD1G93A Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis." *The Journal of Physiology*, February 15;591(Pt 10):2723-45.
- Furukawa T, Nodera H, Shimatani Y, Watanabe O, Miyashiro A, Mori A, Matsui N, Nishida Y, Izumi Y, Kaji R. (2013). "Hyperexcitability as a Potential Cause for Diffuse Lower Motor Neuron Loss in Isaacs' Syndrome." *Neurology and Clinical Neuroscience* 1 (5): 179–81.
- Galluzzi L, Kepp O, Krautwald S, Kroemer G, Linkermann A. (2014). "Molecular Mechanisms of Regulated Necrosis." *Seminars in Cell & Developmental Biology* 35 (2): 24-32.
- Ghatak NR, Campbell WW, Lippman RH, Hadfield MG. (1986). "Anterior Horn Changes of Motor Neuron Disease Associated with Demyelinating Radiculopathy." *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 45 (4): 385–95.
- Gizzi M, DiRocco A, Sivak M, Cohen B. (1992). "Ocular Motor Function in Motor Neuron Disease." *Neurology* 42 (5): 1037–46.
- Glenn LL, Samojla BG, Whitney JF. (1987). "Electrotonic Parameters of Cat Spinal Alpha-Motoneurons Evaluated with an Equivalent Cylinder Model That Incorporates Non-Uniform Membrane Resistivity." *Brain Research* 435 (1-2): 398–402.
- Gong YH, Parsadanian AS, Andreeva A, Snider WD, Elliott JL. (2000). "Restricted Expression of G86R Cu/Zn Superoxide Dismutase in Astrocytes Results in Astrocytosis but Does Not Cause Motoneuron Degeneration." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 20 (2): 660–65.
- Gordon T, Putman CT, Hegedus J. (2007). "Amyotrophic Lateral Sclerosis - Evidence of Early Denervation of Fast-Twitch Muscles." *Basic Applied Myology* 17 (3&4): 141-145.
- Gould TW, Buss RR, Vinsant S, Prevette D, Sun W, Knudson CM, Milligan CE, Oppenheim RW. (2006). "Complete Dissociation of Motor Neuron Death from Motor Dysfunction by Bax Deletion in a Mouse Model of ALS." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 26 (34): 8774–86.
- Granit R, Kernell D, Shortess GK. (1963). "The Behaviour of Mammalian Motoneurons During Long-Lasting Orthodromic, Antidromic and Trans-Membrane Stimulation." *The Journal of Physiology* 169 (12): 743–54.
- Greenwood SM, Mizielinska SM, Frenguelli BG, Harvey J, Connolly CN. (2007). "Mitochondrial Dysfunction and Dendritic Beading during Neuronal Toxicity." *The Journal of Biological Chemistry* 282 (36): 26235–44.
- Grillner S & Udo M. (1971). "Motor Unit Activity and Stiffness of the Contracting Muscle Fibres in the Tonic Stretch Reflex." *Acta Physiologica Scandinavica* 81 (3): 422–24.
- Gros-Louis F, Gaspar C, Rouleau GA. (2006). "Genetics of Familial and Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1762 (11-12): 956–72.
- Grosskreutz J, Van Den Bosch L, Keller BU. (2010). "Calcium Dysregulation in Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Cell Calcium* 47 (2): 165–74.
- Grozdanovic Z. (2001). "NO Message from Muscle." *Microscopy Research and Technique* 55 (3): 148–53.

- Guégan C, Vila M, Rosoklija G, Hays AP, Przedborski S. (2001). "Recruitment of the Mitochondrial-Dependent Apoptotic Pathway in Amyotrophic Lateral Sclerosis." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 21 (17): 6569–76.
- Guertin PA & Hounsgaard J. (1999). "Non-Volatile General Anaesthetics Reduce Spinal Activity by Suppressing Plateau Potentials." *Neuroscience* 88 (2): 353–58.
- Guo H, Lai L, Butchbach MER, Stockinger MP, Shan X, Bishop GA, Lin CIG. (2003). "Increased Expression of the Glial Glutamate Transporter EAAT2 Modulates Excitotoxicity and Delays the Onset but Not the Outcome of ALS in Mice." *Human Molecular Genetics* 12 (19): 2519–32.
- Gurney ME, Pu H, Chiu AY, Dal Canto MC, Polchow CY, Alexander DD, Caliendo J, Hentati A, Kwon YW, Deng HX. (1994). "Motor Neuron Degeneration in Mice That Express a Human Cu,Zn Superoxide Dismutase Mutation." *Science (New York, N.Y.)* 264 (5166): 1772–75.
- Gustafsson B & Pinter MJ. (1984a). "Relations among Passive Electrical Properties of Lumbar Alpha-Motoneurons of the Cat." *The Journal of Physiology* 356 (November): 401–31.
- Gustafsson B & Pinter MJ. (1984b). "An Investigation of Threshold Properties among Cat Spinal Alpha-Motoneurons." *The Journal of Physiology* 357 (December): 453–83.
- Gustafsson B & Pinter MJ. (1985). "Factors Determining the Variation of the Afterhyperpolarization Duration in Cat Lumbar Alpha-Motoneurons." *Brain Research* 326 (2): 392–95.
- Gutfreund Y, Yarom Y, Segev I. (1995). "Subthreshold Oscillations and Resonant Frequency in Guinea-Pig Cortical Neurons: Physiology and Modelling." *The Journal of Physiology* 483 (Pt 3) (March): 621–40.
- Gutman AM. (1971). "[Effectiveness of dendritic synapses]." *Biofizika* 16 (1): 128–34.
- Gutman AM. (1991). "Bistability of Dendrites." *International Journal of Neural Systems* 01 (04): 291–304.
- Halestrap AP, McStay GP, Clarke SJ. (2002). "The Permeability Transition Pore Complex: Another View." *Biochimie* 84 (2-3): 153–66.
- Hammami S, Willumsen NJ, Olsen HL, Morera FJ, Latorre R, Klaerke DA. (2009). "Cell Volume and Membrane Stretch Independently Control K⁺ Channel Activity." *The Journal of Physiology* 587 (Pt 10): 2225–31.
- Hamson DK, Hong Hu J, Krieger C, Watson NV. (2002). "Lumbar Motoneuron Fate in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Neuroreport* 13 (17): 2291–94.
- Hardingham GE, Fukunaga Y, Bading H. (2002). "Extrasynaptic NMDARs Oppose Synaptic NMDARs by Triggering CREB Shut-off and Cell Death Pathways." *Nature Neuroscience* 5 (5): 405–14.
- Harvey PJ, Li X, Li Y, Bennett DJ. (2006a). "Endogenous Monoamine Receptor Activation Is Essential for Enabling Persistent Sodium Currents and Repetitive Firing in Rat Spinal Motoneurons." *Journal of Neurophysiology* 96 (3): 1171–86.

- Harvey PJ, Li X, Li Y, Bennett DJ. (2006b). "Persistent Sodium Currents and Repetitive Firing in Motoneurons of the Sacrocaudal Spinal Cord of Adult Rats." *Journal of Neurophysiology* 96 (3): 1141–57.
- Hasbani MJ, Hyrc KL, Faddis BT, Romano C, Goldberg MP. (1998). "Distinct Roles for Sodium, Chloride, and Calcium in Excitotoxic Dendritic Injury and Recovery." *Experimental Neurology* 154 (1): 241–58.
- Heckman CJ & Lee RH. (1999). "Synaptic Integration in Bistable Motoneurons." *Progress in Brain Research* 123: 49–56.
- Hegedus J, Putman CT, Gordon T. (2007). "Time Course of Preferential Motor Unit Loss in the SOD1 G93A Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Neurobiology of Disease* 28 (2): 154–64.
- Hegedus J, Putman CT, Tyreman N, Gordon T. (2008). "Preferential Motor Unit Loss in the SOD1 G93A Transgenic Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis." *The Journal of Physiology* 586 (14): 3337–51.
- Henneman E. (1957). "Relation between Size of Neurons and Their Susceptibility to Discharge." *Science (New York, N.Y.)* 126 (3287): 1345–47.
- Henneman E. (1985). "The Size-Principle: A Deterministic Output Emerges from a Set of Probabilistic Connections." *The Journal of Experimental Biology* 115 (March): 105–12.
- Henneman E, Somjen G, Carpenter DO. (1965). "Functional Significance of Cell Size in Spinal Motoneurons." *Journal of Neurophysiology* 28 (May): 560–80.
- Higgins CMJ, Jung C, Ding H, Xu Z. (2002). "Mutant Cu, Zn Superoxide Dismutase That Causes Motoneuron Degeneration Is Present in Mitochondria in the CNS." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 22 (6): RC215.
- Higgins CMJ, Jung C, Xu Z. (2003). "ALS-Associated Mutant SOD1G93A Causes Mitochondrial Vacuolation by Expansion of the Intermembrane Space and by Involvement of SOD1 Aggregation and Peroxisomes." *BMC Neuroscience* 4 (July): 16.
- Hirano A, Donnerfeld H, Sasaki S, Nakano I. (1984). "Fine Structural Observations of Neurofilamentous Changes in Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 43 (5): 461–70.
- Hodgkin AL & Huxley AF. (1952). "A Quantitative Description of Membrane Current and Its Application to Conduction and Excitation in Nerve." *The Journal of Physiology* 117 (4): 500–544.
- Holmes WR & Rall W. (1992). "Electrotonic Length Estimates in Neurons with Dendritic Tapering or Somatic Shunt." *Journal of Neurophysiology* 68 (4): 1421–37.
- Hornby TG, McDonagh JC, Reinking RM, Stuart DG. (2002). "Motoneurons: A Preferred Firing Range across Vertebrate Species?" *Muscle & Nerve* 25 (5): 632–48.
- Hoskison MM, Yanagawa Y, Obata K, Shuttleworth CW. (2007). "Calcium-Dependent NMDA-Induced Dendritic Injury and MAP2 Loss in Acute Hippocampal Slices." *Neuroscience* 145 (1): 66–79.

- Hounsgaard J, Hultborn H, Jespersen B, Kiehn O. (1984). "Intrinsic Membrane Properties Causing a Bistable Behaviour of Alpha-Motoneurons." *Experimental Brain Research* 55 (2): 391–94.
- Hounsgaard J, Hultborn H, Jespersen B, Kiehn O. (1988). "Bistability of Alpha-Motoneurons in the Decerebrate Cat and in the Acute Spinal Cat after Intravenous 5-Hydroxytryptophan." *The Journal of Physiology* 405 (November): 345–67.
- Hounsgaard J & Kiehn O. (1989). "Serotonin-Induced Bistability of Turtle Motoneurons Caused by a Nifedipine-Sensitive Calcium Plateau Potential." *The Journal of Physiology* 414 (July): 265–82.
- Hounsgaard J & Mintz I. (1988). "Calcium Conductance and Firing Properties of Spinal Motoneurons in the Turtle." *The Journal of Physiology* 398 (April): 591–603.
- Howe JR & Ritchie JM. (1992). "Multiple Kinetic Components of Sodium Channel Inactivation in Rabbit Schwann Cells." *The Journal of Physiology* 455 (September): 529–66.
- Howland DS, Liu J, She Y, Goad B, Maragakis NJ, Kim B, Erickson J, Kulik J, DeVito L, Psaltis G, DeGennaro LJ, Cleveland DW, Rothstein JD. (2002). "Focal Loss of the Glutamate Transporter EAAT2 in a Transgenic Rat Model of SOD1 Mutant-Mediated Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS)." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (3): 1604–9.
- Hsiao CF, Del Negro CA, Trueblood PR, Chandler SH. (1998). "Ionic Basis for Serotonin-Induced Bistable Membrane Properties in Guinea Pig Trigeminal Motoneurons." *Journal of Neurophysiology* 79 (6): 2847–56.
- Hsiao CF, Trueblood PR, Levine MS, Chandler SH. (1997). "Multiple Effects of Serotonin on Membrane Properties of Trigeminal Motoneurons in Vitro." *Journal of Neurophysiology* 77 (6): 2910–24.
- Huizar P, Kuno M, Kudo N, Miyata Y. (1977). "Reaction of Intact Spinal Motoneurons to Partial Denervation of the Muscle." *The Journal of Physiology* 265 (1): 175–91.
- Hultborn H, Denton ME, Wienecke J, Nielsen JB. (2003). "Variable Amplification of Synaptic Input to Cat Spinal Motoneurons by Dendritic Persistent Inward Current." *The Journal of Physiology* 552 (Pt 3): 945–52.
- Iglesias C, Meunier C, Manuel M, Timofeeva Y, Delestrée N, Zytnicki D. (2011). "Mixed Mode Oscillations in Mouse Spinal Motoneurons Arise from a Low Excitability State." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 31 (15): 5829–40.
- Ignacio S, Moore DH, Smith AP, Lee NM. (2005). "Effect of Neuroprotective Drugs on Gene Expression in G93A/SOD1 Mice." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1053 (August): 121–36.
- Ikegaya Y, Kim JA, Baba M, Iwatsubo T, Nishiyama N, Matsuki N. (2001). "Rapid and Reversible Changes in Dendrite Morphology and Synaptic Efficacy Following NMDA Receptor Activation: Implication for a Cellular Defense against Excitotoxicity." *Journal of Cell Science* 114 (Pt 22): 4083–93.
- Ilieva H, Polymenidou M, Cleveland DW. (2009). "Non-Cell Autonomous Toxicity in Neurodegenerative Disorders: ALS and beyond." *The Journal of Cell Biology* 187 (6): 761–72.

- Ilzecka J. (2007). "Decreased Cerebrospinal Fluid Cytochrome c Levels in Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 67 (3): 264–69.
- Inoue H & Okada Y. (2007). "Roles of Volume-Sensitive Chloride Channel in Excitotoxic Neuronal Injury." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 27 (6): 1445–55.
- Inoue T, Itoh S, Kobayashi M, Kang Y, Matsuo R, Wakisaka S, Morimoto T. (1999). "Serotonergic Modulation of the Hyperpolarizing Spike Afterpotential in Rat Jaw-Closing Motoneurons by PKA and PKC." *Journal of Neurophysiology* 82 (2): 626–37.
- Ito M & Oshima T. (1965). "Electrical Behaviour of the Motoneurone Membrane during Intracellularly Applied Current Steps." *The Journal of Physiology* 180 (3): 607–35.
- Jaarsma D, Haasdijk ED, Grashorn JA, Hawkins R, van Duijn R, Verspaget HW, London J, Holstege JC. (2000). "Human Cu/Zn Superoxide Dismutase (SOD1) Overexpression in Mice Causes Mitochondrial Vacuolization, Axonal Degeneration, and Premature Motoneuron Death and Accelerates Motoneuron Disease in Mice Expressing a Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis Mutant SOD1." *Neurobiology of Disease* 7 (6 Pt B): 623–43.
- Jaarsma D, Rognoni F, van Duijn W, Verspaget HW, Haasdijk ED, Holstege JC. (2001). "CuZn Superoxide Dismutase (SOD1) Accumulates in Vacuolated Mitochondria in Transgenic Mice Expressing Amyotrophic Lateral Sclerosis-Linked SOD1 Mutations." *Acta Neuropathologica* 102 (4): 293–305.
- Jaiswal MK & Keller BU. (2009). "Cu/Zn Superoxide Dismutase Typical for Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis Increases the Vulnerability of Mitochondria and Perturbs Ca²⁺ Homeostasis in SOD1G93A Mice." *Molecular Pharmacology* 75 (3): 478–89.
- Jankowska E. (2001). "Spinal Interneuronal Systems: Identification, Multifunctional Character and Reconfigurations in Mammals." *The Journal of Physiology* 533 (Pt 1): 31–40.
- Jansen JK & Fladby T. (1990). "The Perinatal Reorganization of the Innervation of Skeletal Muscle in Mammals." *Progress in Neurobiology* 34 (1): 39–90.
- Jiang MC & Heckman CJ. (2006). "In Vitro Sacral Cord Preparation and Motoneuron Recording from Adult Mice." *Journal of Neuroscience Methods* 156 (1-2): 31–36.
- Jiang M, Schuster JE, Fu R, Siddique T, Heckman CJ. (2009). "Progressive Changes in Synaptic Inputs to Motoneurons in Adult Sacral Spinal Cord of a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 29 (48): 15031–38.
- Jones KE, Lyons M, Bawa P, Lemon RN. (1994). "Recruitment Order of Motoneurons during Functional Tasks." *Experimental Brain Research* 100 (3): 503–8.
- Jones SM & Lee RH. (2006). "Fast Amplification of Dynamic Synaptic Inputs in Spinal Motoneurons in Vivo." *Journal of Neurophysiology* 96 (5): 2200–2206.
- Julien JP. (2007). "ALS: Astrocytes Move in as Deadly Neighbors." *Nature Neuroscience* 10 (5): 535–37.

- Jung HY, Mickus T, Spruston N. (1997). "Prolonged Sodium Channel Inactivation Contributes to Dendritic Action Potential Attenuation in Hippocampal Pyramidal Neurons." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 17 (17): 6639–46.
- Kaminski HJ, Richmonds CR, Kusner LL, Mitsumoto H. (2002). "Differential Susceptibility of the Ocular Motor System to Disease." *Annals of the New York Academy of Sciences* 956 (April): 42–54.
- Kanai K, Shibuya K, Sato Y, Misawa S, Nasu S, Sekiguchi Y, Mitsuma S, Iose S, Fujimaki S, Ohmori S, Koga S, Kuwabara S. (2012). "Motor Axonal Excitability Properties Are Strong Predictors for Survival in Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 83 (7): 734–38.
- Kang SH, Li Y, Fukaya M, Lorenzini I, Cleveland DW, Ostrow LW, Rothstein JD, Bergles DE. (2013). "Degeneration and Impaired Regeneration of Gray Matter Oligodendrocytes in Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Nature Neuroscience* 16 (5): 571–79.
- Kanning KC, Kaplan A, Henderson CE. (2010). "Motor Neuron Diversity in Development and Disease." *Annual Review of Neuroscience* 33: 409–40.
- Kaspar BK, Lladó J, Sherkat N, Rothstein JD, Gage FH. (2003). "Retrograde Viral Delivery of IGF-1 Prolongs Survival in a Mouse ALS Model." *Science (New York, N.Y.)* 301 (5634): 839–42.
- Kater SB & Nicholson C. (1973). "*Intracellular Staining in Neurobiology.*"
- Kawamata T, Akiyama H, Yamada T, McGeer PL. (1992). "Immunologic Reactions in Amyotrophic Lateral Sclerosis Brain and Spinal Cord Tissue." *The American Journal of Pathology* 140 (3): 691–707.
- Keller GA, Warner TG, Steimer KS, Hallewell RA. (1991). "Cu,Zn Superoxide Dismutase Is a Peroxisomal Enzyme in Human Fibroblasts and Hepatoma Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (16): 7381–85.
- Kernell D. (1968). "The Repetitive Impulse Discharge of a Simple Neurone Model Compared to that of Spinal Motoneurons." *Brain Research* 11 (3): 685–87.
- Kernell D. (1983). "Functional Properties of Spinal Motoneurons and Gradation of Muscle Force." *Advances in Neurology* 39: 213–26.
- Kernell D. (1965). "The Limits of Firing Frequency in Cat Lumbosacral Motoneurons Possessing Different Time Course of Afterhyperpolarization." *Acta Physiologica Scandinavica* 65 (1-2): 87–100.
- Kernell D. (2006). "The Motoneurone and Its Muscle Fibres." *Monographs of the Physiological Society*.
- Kernell D & Sjöholm H. (1973). "Repetitive Impulse Firing: Comparisons between Neurone Models Based on 'Voltage Clamp Equations' and Spinal Motoneurons." *Acta Physiologica Scandinavica* 87 (1): 40–56.
- Kernell D & Zwaagstra B. (1989a). "Size and Remoteness: Two Relatively Independent Parameters of Dendrites, as Studied for Spinal Motoneurons of the Cat." *The Journal of Physiology* 413 (June): 233–54.

- Kernell D & Zwaagstra B. (1989b). "Dendrites of Cat's Spinal Motoneurons: Relationship between Stem Diameter and Predicted Input Conductance." *The Journal of Physiology* 413 (June): 255–69.
- Kiehn O, Kjaerulff O, Tresch MC, Harris-Warrick RM. (2000). "Contributions of Intrinsic Motor Neuron Properties to the Production of Rhythmic Motor Output in the Mammalian Spinal Cord." *Brain Research Bulletin* 53 (5): 649–59.
- Kiernan MC, Vucic S, Cheah BC, Turner MR, Eisen A, Hardiman O, Burrell JR, Zoing MC. (2011). "Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Lancet* 377 (9769): 942–55.
- Kobayashi M, Inoue T, Matsuo R, Masuda Y, Hidaka O, Kang Y, Morimoto T. (1997). "Role of Calcium Conductances on Spike Afterpotentials in Rat Trigeminal Motoneurons." *Journal of Neurophysiology* 77 (6): 3273–83.
- Kong J & Xu Z. (1998). "Massive Mitochondrial Degeneration in Motor Neurons Triggers the Onset of Amyotrophic Lateral Sclerosis in Mice Expressing a Mutant SOD1." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 18 (9): 3241–50.
- Kostic V, Jackson-Lewis V, de Bilbao F, Dubois-Dauphin M, Przedborski S. (1997). "Bcl-2: Prolonging Life in a Transgenic Mouse Model of Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Science (New York, N.Y.)* 277 (5325): 559–62.
- Krnjević K, Puil E, Werman R. (1978). "EGTA and Motoneuronal after-Potentials." *The Journal of Physiology* 275 (February): 199–223.
- Kudina LP. (1999). "Analysis of Firing Behaviour of Human Motoneurons within 'Subprimary Range.'" *Journal of Physiology, Paris* 93 (1-2): 115–23.
- Kudina LP & Alexeeva NL. (1992). "Repetitive Doublets of Human Motoneurons: Analysis of Interspike Intervals and Recruitment Pattern." *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology* 85 (4): 243–47.
- Kuffler SW, Hunt CC, Quilliam JP. (1951). "Function of Medullated Small-Nerve Fibers in Mammalian Ventral Roots; Efferent Muscle Spindle Innervation." *Journal of Neurophysiology* 14 (1): 29–54.
- Kuo JJ, Schonewille M, Siddique T, Schults ANA, Fu R, Bär PR, Anelli R, Heckman CJ, Kroese ABA. (2004). "Hyperexcitability of Cultured Spinal Motoneurons from Presymptomatic ALS Mice." *Journal of Neurophysiology* 91 (1): 571–75.
- Kuo JJ, Lee RH, Zhang L, Heckman CJ. (2006). "Essential Role of the Persistent Sodium Current in Spike Initiation during Slowly Rising Inputs in Mouse Spinal Neurons." *The Journal of Physiology* 574 (Pt 3): 819–34.
- Kuo JJ, Siddique T, Fu R, Heckman CJ. (2005). "Increased Persistent Na(+) Current and Its Effect on Excitability in Motoneurons Cultured from Mutant SOD1 Mice." *The Journal of Physiology* 563 (Pt 3): 843–54.
- Kyle BD, Ahrendt E, Braun AP, Braun JEA. (2013). "The Large Conductance, Calcium-Activated K⁺ (BK) Channel Is Regulated by Cysteine String Protein." *Scientific Reports* 3: 2447.

- Lambrechts D, Storkebaum E, Morimoto M, Del-Favero J, Desmet F, Marklund SL, Wyns S, Thijs V, Andersson J, van Marion I, Al-Chalabi A, Bornes S, Musson R, Hansen V, Beckman L, Adolfsson R, Pall HS, Prats H, Vermeire S, Rutgeerts P, Katayama S, Awata T, Leigh N, Lang-Lazdunski L, Dewerchin M, Shaw C, Moons L, Vlietinck R, Morrison KE, Robberecht W, Van Broeckhoven C, Collen D, Andersen PM, Carmeliet P. (2003). "VEGF Is a Modifier of Amyotrophic Lateral Sclerosis in Mice and Humans and Protects Motoneurons against Ischemic Death." *Nature Genetics* 34 (4): 383–94.
- Langley JN. (1922). "The Nerve Fibre Constitution of Peripheral Nerves and of Nerve Roots." *The Journal of Physiology* 56 (5): 382–96.1.
- Larkman PM & Kelly JS. (1992). "Ionic Mechanisms Mediating 5-Hydroxytryptamine- and Noradrenaline-Evoked Depolarization of Adult Rat Facial Motoneurons." *The Journal of Physiology* 456 (October): 473–90.
- Leblond CS, Kaneb HM, Dion PA, Rouleau GA. (2014). "Dissection of Genetic Factors Associated with Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Experimental Neurology*, April 0014-4886(14)00115-0.
- Lee MK, Marszalek JR, Cleveland DW. (1994). "A Mutant Neurofilament Subunit Causes Massive, Selective Motor Neuron Death: Implications for the Pathogenesis of Human Motor Neuron Disease." *Neuron* 13 (4): 975–88.
- Lee RH & Heckman CJ. (1996). "Influence of Voltage-Sensitive Dendritic Conductances on Bistable Firing and Effective Synaptic Current in Cat Spinal Motoneurons in Vivo." *Journal of Neurophysiology* 76 (3): 2107–10.
- Lee RH & Heckman CJ. (1998a). "Bistability in Spinal Motoneurons in Vivo: Systematic Variations in Persistent Inward Currents." *Journal of Neurophysiology* 80 (2): 583–93.
- Lee RH & Heckman CJ. (1998b). "Bistability in Spinal Motoneurons in Vivo: Systematic Variations in Rhythmic Firing Patterns." *Journal of Neurophysiology* 80 (2): 572–82.
- Lee RH & Heckman CJ. (1999). "Enhancement of Bistability in Spinal Motoneurons in Vivo by the Noradrenergic $\alpha 1$ Agonist Methoxamine." *Journal of Neurophysiology* 81 (5): 2164–74.
- Lee RH & Heckman CJ. (2000). "Adjustable Amplification of Synaptic Input in the Dendrites of Spinal Motoneurons in Vivo." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 20 (17): 6734–40.
- Lee RH & Heckman CJ. (2001). "Essential Role of a Fast Persistent Inward Current in Action Potential Initiation and Control of Rhythmic Firing." *Journal of Neurophysiology* 85 (1): 472–75.
- Lee RH, Kuo JJ, Jiang MC, Heckman CJ. (2003). "Influence of Active Dendritic Currents on Input-Output Processing in Spinal Motoneurons in Vivo." *Journal of Neurophysiology* 89 (1): 27–39.
- Lewis DM, Parry DJ, Rowlerson A. (1982). "Isometric Contractions of Motor Units and Immunohistochemistry of Mouse Soleus Muscle." *The Journal of Physiology* 325 (April): 393–401.
- Liddell EGT & Sherrington CS. (1925). "Recruitment and Some Other Features of Reflex Inhibition." *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character* 97 (686):488-518.

- Lindsay AD & Feldman JL. (1993). "Modulation of Respiratory Activity of Neonatal Rat Phrenic Motoneurons by Serotonin." *The Journal of Physiology* 461 (February): 213–33.
- Lips MB & Keller BU. (1998). "Endogenous Calcium Buffering in Motoneurons of the Nucleus Hypoglossus from Mouse." *The Journal of Physiology* 511 (Pt 1) (August): 105–17.
- Li Y & Bennett DJ. (2003). "Persistent Sodium and Calcium Currents Cause Plateau Potentials in Motoneurons of Chronic Spinal Rats." *Journal of Neurophysiology* 90 (2): 857–69.
- Li Y, Gorassini MA, Bennett DJ. (2004). "Role of Persistent Sodium and Calcium Currents in Motoneuron Firing and Spasticity in Chronic Spinal Rats." *Journal of Neurophysiology* 91 (2): 767–83.
- Llinás RR, Grace AA, Yarom Y. (1991). "In Vitro Neurons in Mammalian Cortical Layer 4 Exhibit Intrinsic Oscillatory Activity in the 10- to 50-Hz Frequency Range." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (3): 897–901.
- Logroscino G, Traynor BJ, Hardiman O, Chiò A, Mitchell D, Swingler RJ, Millul A, Benn E, Beghi E. (2010). "Incidence of Amyotrophic Lateral Sclerosis in Europe." *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 81 (4): 385–90.
- Lorenzo LE, Barbe A, Portalier P, Fritschy JM, Bras H. (2006). "Differential Expression of GABAA and Glycine Receptors in ALS-Resistant vs. ALS-Vulnerable Motoneurons: Possible Implications for Selective Vulnerability of Motoneurons." *The European Journal of Neuroscience* 23 (12): 3161–70.
- Lux HD, Schubert P, Kreutzberg GW, Globus A. (1970). "Excitation and Axonal Flow: Autoradiographic Study on Motoneurons Intracellularly Injected with a 3H-Amino Acid." *Experimental Brain Research* 10 (2): 197–204.
- Magrané J, Sahawneh MA, Przedborski S, Estévez AG, Manfredi G. (2012). "Mitochondrial Dynamics and Bioenergetic Dysfunction Is Associated with Synaptic Alterations in Mutant SOD1 Motor Neurons." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 32 (1): 229–42.
- Mannen T. (2000). "Neuropathological Findings of Onuf's Nucleus and Its Significance." *Neuropathology: Official Journal of the Japanese Society of Neuropathology* 20 Suppl (September): S30–33.
- Manuel M, Iglesias C, Donnet M, Leroy F, Heckman CJ, Zytnicki D. (2009). "Fast Kinetics, High-Frequency Oscillations, and Subprimary Firing Range in Adult Mouse Spinal Motoneurons." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 29 (36): 11246–56.
- Manuel M & Heckman CJ. (2012). "Simultaneous Intracellular Recording of a Lumbar Motoneuron and the Force Produced by Its Motor Unit in the Adult Mouse in Vivo." *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, no. 70: e4312.
- Manuel M, Meunier C, Donnet M, Zytnicki D. (2005). "How Much Afterhyperpolarization Conductance Is Recruited by an Action Potential? A Dynamic-Clamp Study in Cat Lumbar Motoneurons." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 25 (39): 8917–23.

- Manuel M, Meunier C, Donnet M, Zytnicki D. (2006). "The Afterhyperpolarization Conductance Exerts the Same Control over the Gain and Variability of Motoneurone Firing in Anaesthetized Cats." *The Journal of Physiology* 576 (Pt 3): 873–86.
- Manuel M, Meunier C, Donnet M, Zytnicki D. (2007). "Resonant or Not, Two Amplification Modes of Proprioceptive Inputs by Persistent Inward Currents in Spinal Motoneurons." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 27 (47): 12977–88.
- Manuel M & Zytnicki D. (2011). "Alpha, Beta and Gamma Motoneurons: Functional Diversity in the Motor System's Final Pathway." *Journal of Integrative Neuroscience* 10 (3): 243–76.
- Martin E, Cazenave W, Cattaert D, Branchereau P. (2013). "Embryonic Alteration of Motoneuronal Morphology Induces Hyperexcitability in the Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Neurobiology of Disease*, March.
- Martin LJ, Gertz B, Pan Y, Price AC, Molkentin JD, Chang Q. (2009). "The Mitochondrial Permeability Transition Pore in Motor Neurons: Involvement in the Pathobiology of ALS Mice." *Experimental Neurology* 218 (2): 333–46.
- Martin LJ, Liu Z, Chen K, Price AC, Pan Y, Swaby JA, Golden WC. (2007). "Motor Neuron Degeneration in Amyotrophic Lateral Sclerosis Mutant Superoxide Dismutase-1 Transgenic Mice: Mechanisms of Mitochondriopathy and Cell Death." *The Journal of Comparative Neurology* 500 (1): 20–46.
- Martin LJ. (1999). "Neuronal Death in Amyotrophic Lateral Sclerosis Is Apoptosis: Possible Contribution of a Programmed Cell Death Mechanism." *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 58 (5): 459–71.
- Matthews PBC. (1972). "*Mammalian Muscle Receptors and Their Central Actions*."
- Matthews PBC. (2011). "Muscle Spindles: Their Messages and Their Fusimotor Supply." *Handbook of Physiology, The Nervous System, Motor Control* 189-228
- McGuire V, Longstreth Jr WT, Koepsell TD, van Belle G. (1996). "Incidence of Amyotrophic Lateral Sclerosis in Three Counties in Western Washington State." *Neurology* 47 (2): 571–73.
- McLarnon JG. (1995). "Potassium Currents in Motoneurons." *Progress in Neurobiology* 47 (6): 513–31.
- Mcphedran AM, Wuerker RB, Henneman E. (1965a). "Properties of Motor Units in a Heterogeneous Pale Muscle (M. Gastrocnemius) of the Cat." *Journal of Neurophysiology* 28 (January): 85–99.
- Mcphedran AM, Wuerker RB, Henneman E. (1965b). "Properties of Motor Units in a Homogeneous Red Muscle (Soleus) of the Cat." *Journal of Neurophysiology* 28 (January): 71–84.
- Meehan CF, Sukiasyan N, Zhang M, Nielsen JB, Hultborn H. (2010). "Intrinsic Properties of Mouse Lumbar Motoneurons Revealed by Intracellular Recording in Vivo." *Journal of Neurophysiology* 103 (5): 2599–2610.
- Mendell LM & Henneman E. (1968). "Terminals of Single Ia Fibers: Distribution within a Pool of 300 Homonymous Motor Neurons." *Science (New York, N.Y.)* 160 (3823): 96–98.

- Menzies FM, Grierson AJ, Cookson MR, Heath PR, Tomkins J, Figlewicz DA, Ince PG, Shaw PJ. (2002). "Selective Loss of Neurofilament Expression in Cu/Zn Superoxide Dismutase (SOD1) Linked Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Journal of Neurochemistry* 82 (5): 1118–28.
- Menzies FM, Ince PG, Shaw PJ. (2002). "Mitochondrial Involvement in Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Neurochemistry International* 40 (6): 543–51.
- Meunier C & Borejsza K. (2005). "How Membrane Properties Shape the Discharge of Motoneurons: A Detailed Analytical Study." *Neural Computation* 17 (11): 2383–2420.
- Milanese M, Zappettini S, Jacchetti E, Bonifacino T, Cervetto C, Usai C, Bonanno G. (2010). "In Vitro Activation of GAT1 Transporters Expressed in Spinal Cord Gliosomes Stimulates Glutamate Release That Is Abnormally Elevated in the SOD1/G93A(+) Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Journal of Neurochemistry* 113 (2): 489–501.
- Miles GB, Dai Y, Brownstone RM. (2005). "Mechanisms Underlying the Early Phase of Spike Frequency Adaptation in Mouse Spinal Motoneurons." *The Journal of Physiology* 566 (Pt 2): 519–32.
- Mitsumoto H, Pezedborski S, Gordon PH. (2006). "Amyotrophic Lateral Sclerosis."
- Moore JA & Appenteng K. (1991). "The Morphology and Electrical Geometry of Rat Jaw-Elevator Motoneurons." *The Journal of Physiology* 440: 325–43.
- Mosfeldt LA & Reklung JC. (1989). "Electrophysiological Properties of Hypoglossal Motoneurons of Guinea-Pigs Studied in Vitro." *Neuroscience* 30 (3): 619–37.
- Münch C, Ebstein M, Seefried U, Zhu B, Stamm S, Landwehrmeyer GB, Ludolph AC, Schwalenstöcker B, Meyer T. (2002). "Alternative Splicing of the 5'-Sequences of the Mouse EAAT2 Glutamate Transporter and Expression in a Transgenic Model for Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Journal of Neurochemistry* 82 (3): 594–603.
- Murayama S, Inoue K, Kawakami H, Bouldin TW, Suzuki K. (1991). "A Unique Pattern of Astrocytosis in the Primary Motor Area in Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Acta Neuropathologica* 82 (6): 456–61.
- Nagai M, Re DB, Nagata T, Chalazonitis A, Jessell TM, Wichterle H, Przedborski S. (2007). "Astrocytes Expressing ALS-Linked Mutated SOD1 Release Factors Selectively Toxic to Motor Neurons." *Nature Neuroscience* 10 (5): 615–22.
- Nakata M, Kuwabara S, Kanai K, Misawa S, Tamura N, Sawai S, Hattori T, Bostock H. (2006). "Distal Excitability Changes in Motor Axons in Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Clinical Neurophysiology: Official Journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology* 117 (7): 1444–48.
- Neher E. (1995). "The Use of Fura-2 for Estimating Ca Buffers and Ca Fluxes." *Neuropharmacology* 34 (11): 1423–42.
- Nelson PG & Frank K. (1964). "[Action Potential Production Studied by the Voltage Clamp Technique on the Cat Motoneuron]." *Actualités Neurophysiologiques* 5: 15–35.
- Nguyen KT, García-Chacón LE, Barrett JN, Barrett EF, David G. (2009). "The Psi(m) Depolarization That Accompanies Mitochondrial Ca²⁺ Uptake Is Greater in Mutant SOD1 than in Wild-Type Mouse Motor Terminals." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (6): 2007–11.

- Nguyen MD, Larivière RC, Julien JP. (2001). "Deregulation of Cdk5 in a Mouse Model of ALS: Toxicity Alleviated by Perikaryal Neurofilament Inclusions." *Neuron* 30 (1): 135–47.
- Nishimura Y, Schwindt PC, Crill WE. (1989). "Electrical Properties of Facial Motoneurons in Brainstem Slices from Guinea Pig." *Brain Research* 502 (1): 127–42.
- Niwa JI, Ishigaki S, Hishikawa N, Yamamoto M, Doyu M, Murata S, Tanaka S, Taniguchi S, Sobue G. (2002). "Dorfin Ubiquitylates Mutant SOD1 and Prevents Mutant SOD1-Mediated Neurotoxicity." *The Journal of Biological Chemistry* 277 (39): 36793–98.
- Obál I, Engelhardt JI, Siklós L. (2006). "Axotomy Induces Contrasting Changes in Calcium and Calcium-Binding Proteins in Oculomotor and Hypoglossal Nuclei of Balb/c Mice." *The Journal of Comparative Neurology* 499 (1): 17–32.
- Ofengeim D & Yuan J. (2013). "Regulation of RIP1 Kinase Signalling at the Crossroads of Inflammation and Cell Death." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 14 (11): 727–36.
- Okada Y. (2006). "Cell Volume-Sensitive Chloride Channels: Phenotypic Properties and Molecular Identity." *Contributions to Nephrology* 152: 9–24.
- Oosthuysen B, Moons L, Storkebaum E, Beck H, Nuyens D, Brusselmans K, Van Dorpe J, Hellings P, Gorselink M, Heymans S, Theilmeyer G, Dewerchin M, Laudenbach V, Vermeylen P, Raat H, Acker T, Vleminckx V, Van Den Bosch L, Cashman N, Fujisawa H, Drost MR, Sciot R, Bruyninckx F, Hicklin DJ, Ince C, Gressen P, Lupu F, Plate KH, Robberecht W, Herbert JM, Collen D, Carmeliet P. (2001). "Deletion of the Hypoxia-Response Element in the Vascular Endothelial Growth Factor Promoter Causes Motor Neuron Degeneration." *Nature Genetics* 28 (2): 131–38.
- Palecek J, Lips MB, Keller BU. (1999). "Calcium Dynamics and Buffering in Motoneurons of the Mouse Spinal Cord." *The Journal of Physiology* 520 Pt 2 (October): 485–502.
- Palmer SS & Fetz EE. (1985). "Discharge Properties of Primate Forearm Motor Units during Isometric Muscle Activity." *Journal of Neurophysiology* 54 (5): 1178–93.
- Pambo-Pambo A, Durand J, Gueritaud JP. (2009). "Early Excitability Changes in Lumbar Motoneurons of Transgenic SOD1G85R and SOD1G(93A-Low) Mice." *Journal of Neurophysiology* 102 (6): 3627–42.
- Papadimitriou D, Le Verche V, Jacquier A, Ikiz B, Przedborski S, Re DB. (2010). "Inflammation in ALS and SMA: Sorting out the Good from the Evil." *Neurobiology of Disease* 37 (3): 493–502.
- Parkis MA, Bayliss DA, Berger AJ. (1995). "Actions of Norepinephrine on Rat Hypoglossal Motoneurons." *Journal of Neurophysiology* 74 (5): 1911–19.
- Pasinelli P, Houseweart MK, Brown RH, Cleveland DW. (2000). "Caspase-1 and -3 Are Sequentially Activated in Motor Neuron Death in Cu,Zn Superoxide Dismutase-Mediated Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (25): 13901–6.
- Pasinelli P & Brown RH. (2006). "Molecular Biology of Amyotrophic Lateral Sclerosis: Insights from Genetics." *Nature Reviews. Neuroscience* 7 (9): 710–23.

- Patergnani S, Suski JM, Agnoletto C, Bononi A, Bonora M, De Marchi E, Giorgi C, Marchi S, Missiroli S, Poletti F, Rimessi A, Duszynski MR, Pinton P. (2011). "Calcium Signaling around Mitochondria Associated Membranes (MAMs)." *Cell Communication and Signaling: CCS* 9: 19.
- Pieri M, Albo F, Gaetti C, Spalloni A, Bengtson CP, Longone P, Cavalcanti S, Zona C. (2003). "Altered Excitability of Motor Neurons in a Transgenic Mouse Model of Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Neuroscience Letters* 351 (3): 153–56.
- Pieri M, Carunchio I, Curcio L, Mercuri NB, Zona C. (2009). "Increased Persistent Sodium Current Determines Cortical Hyperexcitability in a Genetic Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Experimental Neurology* 215 (2): 368–79.
- Pirooznia SK, Dawson VL, Dawson TM. (2014). "Motor Neuron Death in ALS: Programmed by Astrocytes?" *Neuron* 81 (5): 961–63.
- Powers RK & Binder MD. (2003). "Persistent Sodium and Calcium Currents in Rat Hypoglossal Motoneurons." *Journal of Neurophysiology* 89 (1): 615–24.
- Powers RK & Binder MD. (1995). "Effective Synaptic Current and Motoneuron Firing Rate Modulation." *Journal of Neurophysiology* 74 (2): 793–801.
- Powers RK & Binder MD. (1996). "Experimental Evaluation of Input-Output Models of Motoneuron Discharge." *Journal of Neurophysiology* 75 (1): 367–79.
- Powers RK & Binder MD. (1999). "Models of Spike Encoding and Their Use in the Interpretation of Motor Unit Recordings in Man." *Progress in Brain Research* 123: 83–98.
- Powers RK & Binder MD. (2001). "Input-Output Functions of Mammalian Motoneurons." *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* 143: 137–263.
- Pramatarova A, Laganière J, Roussel J, Brisebois K, Rouleau GA. (2001). "Neuron-Specific Expression of Mutant Superoxide Dismutase 1 in Transgenic Mice Does Not Lead to Motor Impairment." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 21 (10): 3369–74.
- Puls I, Jonnakuty C, LaMonte BH, Holzbaur ELF, Tokito M, Mann E, Floeter MK, Bidus K, Drayna D, Oh SH, Brown RH, Ludlow CL, Fishbeck KH. (2003). "Mutant Dynactin in Motor Neuron Disease." *Nature Genetics* 33 (4): 455–56.
- Pun S, Santos AF, Saxena S, Xu L, Caroni P. (2006). "Selective Vulnerability and Pruning of Phasic Motoneuron Axons in Motoneuron Disease Alleviated by CNTF." *Nature Neuroscience* 9 (3): 408–19.
- Quinlan KA, Schuster JE, Fu R, Siddique T, Heckman CJ. (2011). "Altered Postnatal Maturation of Electrical Properties in Spinal Motoneurons in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis." *The Journal of Physiology* 589 (Pt 9): 2245–60.
- Rall W. (1959). "Branching Dendritic Trees and Motoneuron Membrane Resistivity." *Experimental Neurology* 1 (November): 491–527.
- Rall W. (1969). "Time Constants and Electrotonic Length of Membrane Cylinders and Neurons." *Biophysical Journal* 9 (12): 1483–1508.

- Raoul C, Buhler E, Sadeghi C, Jacquier A, Aebischer P, Pettmann B, Henderson CE, Haase G. (2006). "Chronic Activation in Presymptomatic Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) Mice of a Feedback Loop Involving Fas, Daxx, and FasL." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (15): 6007–12.
- Raoul C, Estévez AG, Nishimune H, Cleveland DW, deLapeyrière O, Henderson CE, Haase G, Pettmann B. (2002). "Motoneuron Death Triggered by a Specific Pathway Downstream of Fas. Potentiation by ALS-Linked SOD1 Mutations." *Neuron* 35 (6): 1067–83.
- Ratovitski T, Corson LB, Strain J, Wong P, Cleveland DW, Culotta VC, Borchelt DR. (1999). "Variation in the Biochemical/biophysical Properties of Mutant Superoxide Dismutase 1 Enzymes and the Rate of Disease Progression in Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis Kindreds." *Human Molecular Genetics* 8 (8): 1451–60.
- Redfern PA. (1970). "Neuromuscular Transmission in New-Born Rats." *The Journal of Physiology* 209 (3): 701–9.
- Re DB, Le Verche V, Yu C, Amoroso MW, Politi KA, Phani S, Ikiz B, Hoffmann L, Koolen M, Nagata T, Papadimitriou D, Nagy P, Mitsumoto H, Kariya S, Wichterle H, Henderson CE, Przedborski S. (2014). "Necroptosis Drives Motor Neuron Death in Models of Both Sporadic and Familial ALS." *Neuron* 81 (5): 1001–8.
- Rekling JC, Funk GD, Bayliss DA, Dong XW, Feldman JL. (2000). "Synaptic Control of Motoneuronal Excitability." *Physiological Reviews* 80 (2): 767–852.
- Richter DW, Schlue WR, Mauritz KH, Nacimiento AC. (1974). "Comparison of Membrane Properties of the Cell Body and the Initial Part of the Axon of Phasic Motoneurons in the Spinal Cord of the Cat." *Experimental Brain Research* 20 (2): 193–206.
- Ritter LK, Tresch MC, Heckman CJ, Manuel M, Tysseling VM. (2014). "Characterization of Motor Units in Behaving Adult Mice Shows a Wide Primary Range." *Journal of Neurophysiology*, 112 (3): 543–51.
- Robberecht W & Philips T. (2013). "The Changing Scene of Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Nature Reviews. Neuroscience* 14 (4): 248–64.
- Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng HX. (1993). "Mutations in Cu/Zn Superoxide Dismutase Gene Are Associated with Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Nature* 362 (6415): 59–62.
- Rose PK. (1981). "Distribution of Dendrites from Biventer Cervicis and Complexus Motoneurons Stained Intracellularly with Horseradish Peroxidase in the Adult Cat." *The Journal of Comparative Neurology* 197 (3): 395–409.
- Rose PK & Cushing S. (1999). "Non-Linear Summation of Synaptic Currents on Spinal Motoneurons: Lessons from Simulations of the Behaviour of Anatomically Realistic Models." *Progress in Brain Research* 123: 99–107.
- Rose PK, OKeirstead SA, Vanner SJ. (1985). "A Quantitative Analysis of the Geometry of Cat Motoneurons Innervating Neck and Shoulder Muscles." *The Journal of Comparative Neurology* 239 (1): 89–107.
- Rothstein JD. (1995). "Excitotoxic Mechanisms in the Pathogenesis of Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Advances in Neurology* 68: 7–20; discussion 21–27.

- Rothstein JD, Tsai G, Kuncl RW, Clawson L, Cornblath DR, Drachman DB, Pestronk A, Stauch BL, Coyle JT. (1990). "Abnormal Excitatory Amino Acid Metabolism in Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Annals of Neurology* 28 (1): 18–25.
- Rothstein JD, Van Kammen M, Levey AI, Martin LJ, Kuncl RW. (1995). "Selective Loss of Glial Glutamate Transporter GLT-1 in Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Annals of Neurology* 38 (1): 73–84.
- Rothstein JD. (2009). "Current Hypotheses for the Underlying Biology of Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Annals of Neurology* 65 Suppl 1 (January): S3–9.
- Rothstein JD, Patel S, Regan MR, Haenggeli C, Huang YH, Bergles DE, Jin L, Dykes Hoberg M, Vidensky S, Chung DS, Toan SV, Bruijn LI, Su ZZ, Gupta P, Fisher PB. (2005). "Beta-Lactam Antibiotics Offer Neuroprotection by Increasing Glutamate Transporter Expression." *Nature* 433 (7021): 73–77.
- Rotterman TM, Nardelli P, Cope TC, Alvarez FJ. (2014). "Normal Distribution of VGLUT1 Synapses on Spinal Motoneuron Dendrites and Their Reorganization after Nerve Injury." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 34 (10): 3475–92.
- Roy J, Minotti S, Dong L, Figlewicz DA, Durham HD. (1998). "Glutamate Potentiates the Toxicity of Mutant Cu/Zn-Superoxide Dismutase in Motor Neurons by Postsynaptic Calcium-Dependent Mechanisms." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 18 (23): 9673–84.
- Rudy B. (1981). "Inactivation in Myxiole Giant Axons Responsible for Slow and Accumulative Adaptation Phenomena." *The Journal of Physiology* 312 (March): 531–49.
- Rudy B. (1988). "Diversity and Ubiquity of K Channels." *Neuroscience* 25 (3): 729–49.
- Sacson RA, Bunton-Stasyshyn RKA, Fisher EMC, Fratta P. (2013). "Is SOD1 Loss of Function Involved in Amyotrophic Lateral Sclerosis?" *Brain: A Journal of Neurology* 136 (Pt 8): 2342–58.
- Sah P. (1996). "Ca(2+)-Activated K⁺ Currents in Neurones: Types, Physiological Roles and Modulation." *Trends in Neurosciences* 19 (4): 150–54.
- Sasaki S, Warita H, Abe K, Komori T, Iwata M. (2001). "EAAT1 and EAAT2 Immunoreactivity in Transgenic Mice with a G93A Mutant SOD1 Gene." *Neuroreport* 12 (7): 1359–62.
- Sawczuk A, Powers RK, Binder MD. (1997). "Contribution of Outward Currents to Spike-Frequency Adaptation in Hypoglossal Motoneurons of the Rat." *Journal of Neurophysiology* 78 (5): 2246–53.
- Saxena S, Cabuy E, Caroni P. (2009). "A Role for Motoneuron Subtype-Selective ER Stress in Disease Manifestations of FALS Mice." *Nature Neuroscience* 12 (5): 627–36.
- Schiaffino S, Ausoni S, Gorza L, Saggin L, Gundersen K, Lomo T. (1988). "Myosin Heavy Chain Isoforms and Velocity of Shortening of Type 2 Skeletal Muscle Fibres." *Acta Physiologica Scandinavica* 134 (4): 575–76.
- Schiffer D, Cordera S, Cavalla P, Migheli A. (1996). "Reactive Astrogliosis of the Spinal Cord in Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Journal of the Neurological Sciences* 139 Suppl (August): 27–33.

- Schlue WR, Richter DW, Mauritz KH, Nacimiento AC. (1974a). "Mechanisms of Accommodation to Linearly Rising Currents in Cat Spinal Motoneurons." *Journal of Neurophysiology* 37 (2): 310–15.
- Schlue WR, Richter DW, Mauritz KH, Nacimiento AC. (1974b). "Responses of Cat Spinal Motoneuron Somata and Axons to Linearly Rising Currents." *Journal of Neurophysiology* 37 (2): 303–9.
- Schlue WR, Richter DW, Mauritz KH, Nacimiento AC. (1974c). "Accommodation of Cat Spinal Motoneurons to Linearly Rising Currents before and during Long-Term Changes of Membrane Potential." *Brain Research* 76 (2): 213–21.
- Schröder HD & Reske-Nielsen E. (1984). "Preservation of the Nucleus X-Pelvic Floor Motoneuron System in Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Clinical Neuropathology* 3 (5): 210–16.
- Schütz B. (2005). "Imbalanced Excitatory to Inhibitory Synaptic Input Precedes Motor Neuron Degeneration in an Animal Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Neurobiology of Disease* 20 (1): 131–40.
- Schwindt PC. (1973). "Membrane-Potential Trajectories Underlying Motoneuron Rhythmic Firing at High Rates." *Journal of Neurophysiology* 36 (3): 434–39.
- Schwindt PC & Calvin WH. (1972). "Membrane-Potential Trajectories between Spikes Underlying Motoneuron Firing Rates." *Journal of Neurophysiology* 35 (3): 311–25.
- Schwindt PC & Calvin WH. (1973). "Nature of Conductances Underlying Rhythmic Firing in Cat Spinal Motoneurons." *Journal of Neurophysiology* 36 (6): 955–73.
- Schwindt PC & Crill WE. (1977). "A Persistent Negative Resistance in Cat Lumbar Motoneurons." *Brain Research* 120 (1): 173–78.
- Schwindt PC & Crill WE. (1980a). "Properties of a Persistent Inward Current in Normal and TEA-Injected Motoneurons." *Journal of Neurophysiology* 43 (6): 1700–1724.
- Schwindt PC & Crill WE. (1980b). "Effects of Barium on Cat Spinal Motoneurons Studied by Voltage Clamp." *Journal of Neurophysiology* 44 (4): 827–46.
- Schwindt PC & Crill WE. (1980c). "Role of a Persistent Inward Current in Motoneuron Bursting during Spinal Seizures." *Journal of Neurophysiology* 43 (5): 1296–1318.
- Schwindt PC & Crill WE. (1982). "Factors Influencing Motoneuron Rhythmic Firing: Results from a Voltage-Clamp Study." *Journal of Neurophysiology* 48 (4): 875–90.
- Schwindt PC & Crill WE. (1984). "Membrane Properties of Cat Spinal Motoneurons." In *Handbook of the Spinal Cord*, Marcel Dekker, 199–246.
- Scutter SD & Türker KS. (1998). "Recruitment Stability in Masseter Motor Units during Isometric Voluntary Contractions." *Muscle & Nerve* 21 (10): 1290–98.
- Sekerli M, Del Negro CA, Lee RH, Butera RJ. (2004). "Estimating Action Potential Thresholds from Neuronal Time-Series: New Metrics and Evaluation of Methodologies." *IEEE Transactions on Bio-Medical Engineering* 51 (9): 1665–72.

- Shaw IC, Fitzmaurice PS, Mitchell JD, Lynch PG. (1995). "Studies on Cellular Free Radical Protection Mechanisms in the Anterior Horn from Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Neurodegeneration: A Journal for Neurodegenerative Disorders, Neuroprotection, and Neuroregeneration* 4 (4): 391–96.
- Shibata N. (2001). "Transgenic Mouse Model for Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis with Superoxide Dismutase-1 Mutation." *Neuropathology: Official Journal of the Japanese Society of Neuropathology* 21 (1): 82–92.
- Siklós L, Engelhardt J, Harati Y, Smith RG, Joó F, Appel SH. (1996). "Ultrastructural Evidence for Altered Calcium in Motor Nerve Terminals in Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Annals of Neurology* 39 (2): 203–16.
- Simon M, Perrier JF, Hounsgaard J. (2003). "Subcellular Distribution of L-Type Ca²⁺ Channels Responsible for Plateau Potentials in Motoneurons from the Lumbar Spinal Cord of the Turtle." *The European Journal of Neuroscience* 18 (2): 258–66.
- Spreux-Varoquaux O, Bensimon G, Lacomblez L, Salachas F, Pradat PF, Le Forestier N, Marouan A, Dib M, Meininger V. (2002). "Glutamate Levels in Cerebrospinal Fluid in Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Reappraisal Using a New HPLC Method with Coulometric Detection in a Large Cohort of Patients." *Journal of the Neurological Sciences* 193 (2): 73–78.
- Stein JM & Padykula HA. (1962). "Histochemical Classification of Individual Skeletal Muscle Fibers of the Rat." *The American Journal of Anatomy* 110 (March): 103–23.
- Storkebaum E, Lambrechts D, Dewerchin M, Moreno-Murciano MP, Appelmans S, Oh H, Van Damme P, Rutteen B, Man WY, De Mol M, Wyns S, Manka D, Vermeulen K, Van Den Bosch L, Mertens N, Schmitz C, Robberecht W, Conway EM, Collen D, Moons L, Carmeliet P. (2005). "Treatment of Motoneuron Degeneration by Intracerebroventricular Delivery of VEGF in a Rat Model of ALS." *Nature Neuroscience* 8 (1): 85–92.
- Sturtz LA, Diekert K, Jensen LT, Lill R, Culotta VC. (2001). "A Fraction of Yeast Cu,Zn-Superoxide Dismutase and Its Metallochaperone, CCS, Localize to the Intermembrane Space of Mitochondria. A Physiological Role for SOD1 in Guarding against Mitochondrial Oxidative Damage." *The Journal of Biological Chemistry* 276 (41): 38084–89.
- Sunico CR, Domínguez G, García-Verdugo JM, Osta R, Montero F, Moreno-López B. (2011). "Reduction in the Motoneuron Inhibitory/excitatory Synaptic Ratio in an Early-Symptomatic Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)* 21 (1): 1–15.
- Svirskis G & Hounsgaard J. (1998). "Transmitter Regulation of Plateau Properties in Turtle Motoneurons." *Journal of Neurophysiology* 79 (1): 45–50.
- Swash M & Fox KP. (1974). "The Pathology of the Human Muscle Spindle: Effect of Denervation." *Journal of the Neurological Sciences* 22 (1): 1–24.
- Swash M & Ingram D. (1988). "Preclinical and Subclinical Events in Motor Neuron Disease." *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 51 (2): 165–68.
- Tadic V, Prell T, Lautenschlaeger J, Grosskreutz J. (2014). "The ER Mitochondria Calcium Cycle and ER Stress Response as Therapeutic Targets in Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Frontiers in Cellular Neuroscience* 8: 147.

- Takahashi K & Naruse K. (2012). "Stretch-Activated BK Channel and Heart Function." *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 110 (2-3): 239–44.
- Takahashi T. (1990). "Inward Rectification in Neonatal Rat Spinal Motoneurons." *The Journal of Physiology* 423 (April): 47–62.
- Talley EM, Sadr NN, Bayliss DA. (1997). "Postnatal Development of Serotonergic Innervation, 5-HT_{1A} Receptor Expression, and 5-HT Responses in Rat Motoneurons." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 17 (11): 4473–85.
- Tamura N, Kuwabara S, Misawa S, Kanai K, Nakata M, Sawai S, Hattori T. (2006). "Increased Nodal Persistent Na⁺ Currents in Human Neuropathy and Motor Neuron Disease Estimated by Latent Addition." *Clinical Neurophysiology: Official Journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology* 117 (11): 2451–58.
- Tortarolo M, Grignaschi G, Calvaresi N, Zennaro E, Spaltro G, Colovic M, Fracasso C, Guiso G, Elger B, Schneider H, Seilheimer B, Caccia S, Bendotti C. (2006). "Glutamate AMPA Receptors Change in Motor Neurons of SOD1G93A Transgenic Mice and Their Inhibition by a Noncompetitive Antagonist Ameliorates the Progression of Amyotrophic Lateral Sclerosis-like Disease." *Journal of Neuroscience Research* 83 (1): 134–46.
- Traub RD. (1977). "Motorneurons of Different Geometry and the Size Principle." *Biological Cybernetics* 25 (3): 163–76.
- Traub RD & Llinás R. (1977). "The Spatial Distribution of Ionic Conductances in Normal and Axotomized Motorneurons." *Neuroscience* 2 (6): 829–49.
- Trotti D, Rolfs A, Danbolt NC, Brown Jr RH, Hediger MA. (1999). "SOD1 Mutants Linked to Amyotrophic Lateral Sclerosis Selectively Inactivate a Glial Glutamate Transporter." *Nature Neuroscience* 2 (9): 848.
- Turkin VV, O'Neill D, Jung R, Iarkov A, Hamm TM. (2010). "Characteristics and Organization of Discharge Properties in Rat Hindlimb Motoneurons." *Journal of Neurophysiology* 104 (3): 1549–65.
- Turner BJ & Talbot K. (2008). "Transgenics, Toxicity and Therapeutics in Rodent Models of Mutant SOD1-Mediated Familial ALS." *Progress in Neurobiology* 85 (1): 94–134.
- Turner MR, Bowser R, Bruijn L, Dupuis L, Ludolph A, McGrath M, Manfredi G, Maragakis N, Miller RG, Pullman SL, Rutkove SB, Shaw PJ, Shefner J, Gishbeck KH. (2013). "Mechanisms, Models and Biomarkers in Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Amyotrophic Lateral Sclerosis & Frontotemporal Degeneration* 14 Suppl 1 (May): 19–32.
- Ulfhake B & Kellerth JO. (1981). "A Quantitative Light Microscopic Study of the Dendrites of Cat Spinal Alpha-Motoneurons after Intracellular Staining with Horseradish Peroxidase." *The Journal of Comparative Neurology* 202 (4): 571–83.
- Ulfhake B & Kellerth JO. (1983). "A Quantitative Morphological Study of HRP-Labelled Cat Alpha-Motoneurons Supplying Different Hindlimb Muscles." *Brain Research* 264 (1): 1–19.
- Ulfhake B & Kellerth JO. (1984). "Electrophysiological and Morphological Measurements in Cat Gastrocnemius and Soleus Alpha-Motoneurons." *Brain Research* 307 (1-2): 167–79.

- Umekiya M & Berger AJ. (1994). "Properties and Function of Low- and High-Voltage-Activated Ca²⁺ Channels in Hypoglossal Motoneurons." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 14 (9): 5652–60.
- Vallbo AB. (1964). "Accommodation Related to Inactivation of the Sodium Permeability in Single Myelinated Nerve Fibres from *Xenopus Laevis*." *Acta Physiologica Scandinavica* 61 (August): 429–44.
- Van Damme P, Bogaert E, Dewil M, Hersmus N, Kiraly D, Scheveneels W, Bockx I, Braeken D, Verpoorten N, Verhoeven K, Timmerman V, Herijgers P, Callewaert G, Carmeliet P, Van Den Bosch L, Robberecht W. (2007). "Astrocytes Regulate GluR2 Expression in Motor Neurons and Their Vulnerability to Excitotoxicity." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (37): 14825–30.
- Van Deerlin VM, Leverenz JB, Bekris LM, Bird TD, Yuan W, Elman LB, Clay D, Wood EM, Chan-Plotkin AS, Martinez-Lage M, Steinhart E, McCluskey L, Grossman M, Neumann M, Wu IL, Yang WS, Kalb R, Galasko DR, Montine TJ, Trojanowski JQ, Lee VMY, Schellenberg G, Yu CE. (2008). "TARDBP Mutations in Amyotrophic Lateral Sclerosis with TDP-43 Neuropathology: A Genetic and Histopathological Analysis." *The Lancet. Neurology* 7 (5): 409–16.
- Van Essen DC, Gordon H, Soha JM, Fraser SE. (1990). "Synaptic Dynamics at the Neuromuscular Junction: Mechanisms and Models." *Journal of Neurobiology* 21 (1): 223–49.
- Vanselow BK & Keller BU. (2000). "Calcium Dynamics and Buffering in Oculomotor Neurones from Mouse That Are Particularly Resistant during Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS)-Related Motoneurone Disease." *The Journal of Physiology* 525 Pt 2 (June): 433–45.
- Van Zundert B, Peuscher MH, Hynynen M, Chen A, Neve RL, Brown RH, Constantine-Paton M, Bellingham MC. (2008). "Neonatal Neuronal Circuitry Shows Hyperexcitable Disturbance in a Mouse Model of the Adult-Onset Neurodegenerative Disease Amyotrophic Lateral Sclerosis." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 28 (43): 10864–74.
- Veldink JH, Bär PR, Joosten EJ, Otten M, Wokke JHJ, Van Den Berg LH. (2003). "Sexual Differences in Onset of Disease and Response to Exercise in a Transgenic Model of ALS." *Neuromuscular Disorders: NMD* 13 (9): 737–43.
- Viana F, Bayliss DA, Berger AJ. (1993a). "Multiple Potassium Conductances and Their Role in Action Potential Repolarization and Repetitive Firing Behavior of Neonatal Rat Hypoglossal Motoneurons." *Journal of Neurophysiology* 69 (6): 2150–63.
- Viana F, Bayliss DA, Berger AJ. (1993b). "Calcium Conductances and Their Role in the Firing Behavior of Neonatal Rat Hypoglossal Motoneurons." *Journal of Neurophysiology* 69 (6): 2137–49.
- Vinay L, Brocard F, Pflieger JF, Simeoni-Alias J, Clarac F. (2000). "Perinatal Development of Lumbar Motoneurons and Their Inputs in the Rat." *Brain Research Bulletin* 53 (5): 635–47.
- Vucic S & Kiernan MC. (2006). "Axonal Excitability Properties in Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Clinical Neurophysiology: Official Journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology* 117 (7): 1458–66.

- Wainger BJ, Kiskinis E, Mellin C, Wiskow O, Han SSW, Sandoe J, Perez JP, Williams LA, Lee S, Boulting G, Berry JD, Brown RH Jr, Cudkowicz ME, Bean BP, Eggan K, Woolf CF. (2014). "Intrinsic Membrane Hyperexcitability of Amyotrophic Lateral Sclerosis Patient-Derived Motor Neurons." *Cell Reports* 7 (1): 1–11.
- Wang L, Deng HX, Grisotti G, Zhai H, Siddique T, Roos RP. (2009). "Wild-Type SOD1 Overexpression Accelerates Disease Onset of a G85R SOD1 Mouse." *Human Molecular Genetics* 18 (9): 1642–51.
- Wang Y, Mao YO, Xie L, Banwait S, Marti HH, Greenberg DA, Jin K. (2007). "Vascular Endothelial Growth Factor Overexpression Delays Neurodegeneration and Prolongs Survival in Amyotrophic Lateral Sclerosis Mice." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 27 (2): 304–7.
- Wiedau-Pazos M, Goto JJ, Rabizadeh S, Gralla EB, Roe JA, Lee MK, Valentine JS, Bredesen DE. (1996). "Altered Reactivity of Superoxide Dismutase in Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Science (New York, N.Y.)* 271 (5248): 515–18.
- Williams GSB, Boyman L, Chikando AC, Khairallah RJ, Lederer WJ. (2013). "Mitochondrial Calcium Uptake." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (26): 10479–86.
- Williamson TL & Cleveland DW. (1999). "Slowing of Axonal Transport Is a Very Early Event in the Toxicity of ALS-Linked SOD1 Mutants to Motor Neurons." *Nature Neuroscience* 2 (1): 50–56.
- Wohlfart G. (1959). "Clinical Considerations on Innervation of Skeletal Muscle." *American Journal of Physical Medicine* 38 (December): 223–30.
- Wong PC, Pardo CA, Borchelt DR, Lee MK, Copeland NG, Jenkins NK, Sisodia SS, Cleveland DW, Price DL. (1995). "An Adverse Property of a Familial ALS-Linked SOD1 Mutation Causes Motor Neuron Disease Characterized by Vacuolar Degeneration of Mitochondria." *Neuron* 14 (6): 1105–16.
- Wong PC, Cai H, Borchelt DR, Price DL. (2002). "Genetically Engineered Mouse Models of Neurodegenerative Diseases." *Nature Neuroscience* 5 (7): 633–39.
- Wooley CM, Sher RB, Kale A, Frankel WN, Cox GA, Seburn KL. (2005). "Gait Analysis Detects Early Changes in Transgenic SOD1(G93A) Mice." *Muscle & Nerve* 32 (1): 43–50.
- Xu Z, Cork LC, Griffin JW, Cleveland DW. (1993). "Involvement of Neurofilaments in Motor Neuron Disease." *Journal of Cell Science. Supplement* 17: 101–8.
- Yamanaka K, Boillee S, Roberts EA, Garcia ML, McAlonis-Downes M, Mikse OR, Cleveland DW, Goldstein LSB. (2008). "Mutant SOD1 in Cell Types Other than Motor Neurons and Oligodendrocytes Accelerates Onset of Disease in ALS Mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (21): 7594–99.
- Yim HS, Kang JH, Chock PB, Stadtman ER, Yim MB. (1997). "A Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis-Associated A4V Cu, Zn-Superoxide Dismutase Mutant Has a Lower Km for Hydrogen Peroxide. Correlation between Clinical Severity and the Km Value." *The Journal of Biological Chemistry* 272 (14): 8861–63.
- Yim MB, Yim HS, Chock PB, Stadtman ER. (1999). "Enhanced Free Radical Generation of FALS-Associated Cu,Zn-SOD Mutants." *Neurotoxicity Research* 1 (2): 91–97.

- Zengel JE, Reid SA, Sybert GW, Munson JB. (1985). "Membrane Electrical Properties and Prediction of Motor-Unit Type of Medial Gastrocnemius Motoneurons in the Cat." *Journal of Neurophysiology* 53 (5): 1323–44.
- Zhang L & Krnjević K. (1986). "Effects of 4-Aminopyridine on the Action Potential and the after-Hyperpolarization of Cat Spinal Motoneurons." *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 64 (11): 1402–6.
- Zhang L & Krnjević K. (1987). "Apamin Depresses Selectively the after-Hyperpolarization of Cat Spinal Motoneurons." *Neuroscience Letters* 74 (1): 58–62.
- Zhang L & Krnjević K. (1988). "Intracellular Injection of Ca²⁺ Chelator Does Not Affect Spike Repolarization of Cat Spinal Motoneurons." *Brain Research* 462 (1): 174–80.
- Zwaagstra B & Kernell D. (1980). "The Duration of after-Hyperpolarization in Hindlimb Alpha Motoneurons of Different Sizes in the Cat." *Neuroscience Letters* 19 (3): 303–7.

Résumé

Les motoneurones tiennent une place remarquable dans l'organisme : ils constituent l'interface entre le système nerveux central et le système musculaire. Leur excitabilité est une caractéristique primordiale dans le comportement moteur puisqu'elle définit la force musculaire développée en réponse à la commande motrice. Chez la souris, la décharge des motoneurones est marquée par la présence d'oscillations de mode mixte (MMOs) entre les potentiels d'action. Ces MMOs permettent la décharge des motoneurones à basse fréquence et sont responsables d'un régime de décharge particulier nommé zone sous-primaire, pendant lequel la fréquence de décharge est très variable et le gain de la relation courant-fréquence élevé.

Nous avons étudié les mécanismes responsables de l'apparition de ces MMOs à la fois de manière expérimentale, dans une préparation *in vivo* de souris anesthésié, incluant l'utilisation du *Dynamic Clamp*, et théorique, au moyen d'un modèle mono-compartimental de motoneurone. Nos résultats ont montré que ces MMOs étaient causées par les courants sodiques et potassiques responsables des potentiels d'action et qu'elles émergeaient d'un état de faible excitabilité de la membrane, dû à l'inactivation lente des courants sodiques. Nous avons également montré que le courant de post-hyperpolarisation pouvait paradoxalement augmenter l'excitabilité des motoneurones et réduire les MMOs en dé-inactivant le courant sodique.

La Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA) conduit à la dégénérescence spécifique de ces motoneurones qui s'accompagne d'une vacuolisation de leur arborisation dendritique. L'augmentation précoce de l'excitabilité des motoneurones dans la maladie a largement été évoquée pour rendre compte de leur atteinte. Une hyperexcitabilité, aussi bien d'origine intrinsèque qu'extrinsèque pourrait en effet produire une excitotoxicité délétère pour la cellule. Si une telle modification de l'excitabilité est en cause dans la maladie, elle devrait persister jusqu'aux âges auxquels se produisent les premières dénervations des jonctions neuromusculaires.

Nous avons enregistré les propriétés électrophysiologiques des motoneurones dans une préparation *in vivo* de souris adultes SOD1-G93A, modèle de la SLA. Nos résultats ont montré que leur conductance d'entrée était augmentée dans les jours qui précèdent les premières dénervations de leurs jonctions neuromusculaires. Malgré cela, leur excitabilité n'était pas modifiée. Loin d'être intrinsèquement hyperexcitables, une fraction d'entre eux perdaient même leur capacité à décharger de manière répétée.

Nous avons finalement étudié la vacuolisation qui prend place dans les dendrites des motoneurones au cours de la maladie et son lien avec la couverture synaptique. Nous avons montré que la vacuolisation dendritique prenait place avant les dénervations et que la taille des vacuoles augmentait avec l'âge des souris SOD1-G93A. De manière intéressante, cette progression semblait plus rapide dans les motoneurones les plus sensibles à la maladie. Bien que la couverture synaptique n'était pas modifiée au cours de la maladie, nous avons mis en évidence une densité de synapses excitatrices et inhibitrices plus importante sur les régions dendritiques qui se vacuolisent.

Ces résultats suggèrent un lien entre l'activité synaptique et la formation de vacuoles dans les motoneurones au cours de la SLA. Les motoneurones ne présentant pas d'hyperexcitabilité intrinsèque, une excitotoxicité d'origine synaptique pourrait alors être responsable de leur dégénérescence.